

UNIVERSITÉ DE CLERMONT
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970

N 54

T H È S E

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Jean-Paul A U D Y

Pharmacien

Présentée et soutenue publiquement le 29 Juin 1970

**CONTRIBUTION A L'ETUDE CRITIQUE ET
EXPERIMENTALE DE LA GUANINE-DESAMINASE.**

Président : M. DASTUGUE, Professeur

Membres de Jury : M. TRONCHE, Professeur
M. BASTIDE, Professeur

CLERMONT - REPRODUCTION

64, avenue Jean Noellet

63 - AUBIERE (1970)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE CLERMONT
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970

N

T H È S E
pour le
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Université)
par

Jean-Paul A U D Y

Pharmacien

Présentée et soutenue publiquement le 29 Juin 1970

**CONTRIBUTION A L'ETUDE CRITIQUE ET
EXPERIMENTALE DE LA GUANINE-DESAMINASE.**

Président : M. DASTUGUE, Professeur

Membres de Jury : M. TRONCHE, Professeur
M. BASTIDE, Professeur

CLERMONT - REPRODUCTION

64, avenue Jean Noellet

63 - AUBIERE (1970)



UNIVERSITE

DE
CLERMONT

FACULTE MIXTE DE MEDECINE et de PHARMACIE

Doyen : G. MEYNIEL
Assesseur : M. COULET

Doyen Honoraire : M. CUVELIER Directeur Honoraire : M. MERLE

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET - MM. BUREAU,
M. POMMÉ - M. WILLEMIN-CLOG
M. GERMAIN - M. VAURS

I - Professeurs Titulaires.

MM. BARRIER	Clinique Chirurgicale
BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	Clinique Obstétricale
BERGER	Chimie Analytique
BERGERON	Pathologie Médicale
CLUZEL	Bactériologie
COULET	Botanique et Microbiologie
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	Biochimie Médicale
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	Anatomie Pathologique
DUCHENE-MARULLAZ	Pharmacologie
FEBVRE	Pharmacie Galénique
FOURRIER	Orthopédie
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM. GRAS	Clinique Médicale A
JACQUEMET	Technique Chirurgicale
JALLUT	Sémiologie Médicale
JANNY	Neuro-Chirurgie
LATAIX	Clinique Chirurgicale
MERCIER	Anatomie
MEYNIEL	Biophysique Médicale
MOLINA	Clinique Pneumo-phtisiologique
PETIT	Médecine Légale et Médecine Sociale
POROT	Clinique Neurologique et Psychiatrie
POURRAT	Matière Médicale
Me RAMPON	Thérapeutique
MM. ROUHER	Clinique Ophtalmologique
TERRASSE	Clinique Médicale B
THIEBLOT	Physiologie
THOMAS	Clinique Oto-Rhino-Laryngologie
TRONCHE	Pharmacie Chimique
TURCHINI	Histologie et Embryologie

II - Professeurs Titulaires à Titre Personnel.

MM. ALFIERI	Biophysique Médicale
CHAMPEIX	Médecine Légale et Médecine du Travail
VIALLET	Electro-Radiologie

III - Professeurs sans Chaire.

Mle CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
MM. MENUT	Pédiatrie et Puériculture
PIGNIDE	Médecine Générale
Mme POURRAT	Matière Médicale

IV - Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. ANDRAUD	Toxicologie
BAGUET	Thérapeutique, Réanimation Médicale
BOUCHER	Physiologie
BOURDEIX	Chirurgie Générale
CONSTANTIN	Anesthésiologie
COUQUELET	Pharmacie Chimique
GAILLARD DE COLLOGNY	Oto-Rhino-Laryngologie
GENTOU	Biochimie Médicale
MALET	Histologie, Embryologie, Cytogénétique
MARCHEIX	Médecine Interne
Mme MOINADE	Médecine Générale et Thérapeutique
MM. NEVEU	Urologie
PERI	Stomatologie
Mme PETIT	Chimie Analytique
MM. PLAGNE	Cancérologie Clinique
RAYNAUD	Pédiatrie
SOLE	Ophthalmologie
VENRIÈS de LAGUILLAUMIE	Anatomie Pathologique

V - Agrégés.

RENARD	Pneumo-Phtisiologie
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie

VI - Délégués dans les Fonctions de Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. AIACHE	Pharmacie Galénique
BOYER	Chimie Biologique
GUILLLOT	Botanique
VANNEUVILLE	Anatomie

Attaché Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentées à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération du 6 Juin 1956).

A MES PARENTS

*Qui m'ont permis d'accéder à la profession
pharmaceutique, en témoignage de ma vive
reconnaissance.*

A MA FEMME

*Qui m'a sans cesse soutenu et aidé dans l'éla-
boration de ce travail.*

A MES ENFANTS

A MES BEAUX PARENTS

A MA SOEUR et A MON BEAU FRERE

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

*Monsieur le Professeur DASTUGUE
Professeur de Biochimie Médicale
Docteur en Médecine et en Pharmacie
Docteur ès-Sciences
Biologiste des Hôpitaux
Lauréat de l'Académie de Médecine
et de l'Académie des Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur
Commandeur de la Santé Publique
Officier des Palmes Académiques
Officier de l'Ordre National du Mérite*

*Il nous a fait l'honneur de nous accueillir
dans son laboratoire. Il nous a inspiré le
sujet de cette thèse et en a guidé sans ces-
se l'exécution de ses conseils éclairés.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre respectueuse gratitude et de no-
tre profonde reconnaissance.*

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur TRONCHE

Professeur de Pharmacie Chimique

Chevalier des Palmes Académiques

*Qui nous a fait l'honneur de juger cette
thèse, en témoignage de gratitude et de
profond respect.*

Monsieur le Professeur BASTIDE

Professeur de Chimie Biologique

et de Pharmacodynamie

Pharmacien Chef des Hôpitaux

Chevalier des Palmes Académiques.

*En témoignage de notre respectueuse gra-
titude pour tous les conseils qu'il a bien
voulu nous prodiguer et la part qu'il a
prise dans la direction de ce travail.*

INTRODUCTION

La guanase ou guanine désaminase est une enzyme qui joue un rôle très important dans le métabolisme des purines puisqu'elle intervient directement dans leur cycle, en permettant la transformation de la guanine en xanthine.

C'est un ferment extrêmement répandu et qui a été mis en évidence aussi bien chez des micro-organismes que chez les êtres les plus évolués.

Après sa découverte par SCHMIDT (108) (109), en 1932, KALKAR (59) (60) propose une méthode d'appréciation de l'activité enzymatique par les modifications de leur absorption spectrale dans l'ultra violet au cours de leur dégradation par des ferments spécifiques. Dès cette époque, les travaux se multiplient et font état de la large répartition de cette enzyme dans le règne animal.

Par ailleurs, un nouveau pôle d'intérêt apparut dans l'étude de la guanase lorsque les auteurs Américains HUE et FREE (51) (52), d'une part et WHITEHOUSE et SANTOS, d'autre part (127) (64), ainsi que les Italiens GIUSTI et GALANTI (36) se penchèrent plus particulièrement sur le problème de la guanase sérique et ses possibilités d'adaptation en tant que test hépatique destiné à faciliter le diagnostic de l'hépatite virale.

Enfin, la mise au point de techniques simplifiées, l'intérêt du dosage de la guanase sérique en pathologie hépatique et l'étude de sa répartition dans les tissus normaux et néoplasiques ont fait que l'étude de cette enzyme devait être reprise sur un plan plus systématique.

Il est donc apparu à notre Maître Monsieur le Professeur DASTUGUE, qu'une étude de cette enzyme, plus particulièrement en ce qui concerne sa répartition dans le règne animal, était susceptible d'être présentée comme thèse de Doctorat en Pharmacie.

Notre mémoire est divisé en deux parties :

- Dans une première partie bibliographique, nous étudierons, le plus brièvement possible, les travaux antérieurs en adoptant le plan suivant :
 - Historique et définition de l'enzyme
 - Le métabolisme des purines
 - Technique de détection et de dosage - Nature du substrat
 - Purification
 - Répartition
 - Propriétés de la guanine désaminase - Cinétique enzymatique
 - Inhibiteurs et effecteurs
 - Rôle physio-pathologique.
- Dans une deuxième partie expérimentale, nous avons étudié :
 - L'influence de la conservation, de la congélation et de la décongélation
 - La répartition de l'activité enzymatique chez un mammifère : le Cobaye et chez un poikilotherme : la Vipère commune.
 - L'activité enzymatique du sérum et du plasma d'un certain nombre d'espèces animales.

Nous ne saurions terminer cette introduction sans exprimer notre respectueuse reconnaissance à notre Maître Monsieur le Professeur DASTUGUE qui a dirigé ce travail en nous faisant profiter de sa grande compétence après en avoir inspiré le sujet et nos sincères remerciements à Monsieur le Professeur BASTIDE pour l'intérêt qu'il a toujours porté à notre travail et les conseils qu'il a bien voulu nous procurer.

P R E M I E R E P A R T I E

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES.

CHAPITRE I : Historique et définition de l'enzyme.

CHAPITRE II : Le métabolisme des purines:

CHAPITRE III: Techniques de détection et de dosage.

CHAPITRE IV: Purification, isolement et constitution de l'enzyme.

CHAPITRE V : Préparation de l'enzyme.

CHAPITRE VI : Propriétés de la guanine désaminase
Cinétique enzymatique.

CHAPITRE VII: Effecteurs et inhibiteurs.

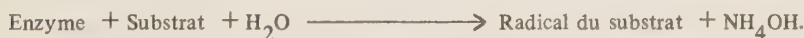
CHAPITRE VIII: Rôle physio-pathologique.

C H A P I T R E I

HISTORIQUE ET DEFINITION DE L'ENZYME.

En 1932, SCHMIDT (105) observa l'existence dans le foie de lapin d'activités enzymatiques capables de catalyser l'hydrolyse ou la synthèse des purines et supposa de façon plus précise la présence d'une enzyme susceptible de catalyser l'hydrolyse de la guanine.

La guanase fait donc ici son apparition en tant qu'enzyme permettant la désamination de la guanine et sa transformation en xanthine. La réaction est du type :



D'après la nomenclature officielle telle qu'elle est définie dans ENZYMES (28), il convient actuellement de la désigner suivant la numérotation suivante :

3 . 5 . 4 . 3 .

Le premier chiffre 3 signifie que nous sommes en présence d'une hydrolase, le chiffre 5 précise que l'enzyme agit sur les liaisons — C — N autres que les liaisons peptides, l'ensemble 3 . 5 . 4 . indique qu'elle agit sur les cycles amidines et enfin le dernier chiffre 3 est le numéro propre de l'enzyme considérée. Il ressort de ceci que la guanase peut tout aussi bien s'appeler guanine désaminase comme ce fut le cas autrefois, que guanine - aminohydrolase, dénomination que l'on trouve actuellement dans les travaux les plus récents de CURRIE, BERGEL et BRAY (24).

SCHMIDT (106) qui tentait de définir une technique efficace de dosage des purines, entrevit pour la première fois les possibilités que pouvait offrir l'emploi d'enzymes appropriées. Se penchant plus particulièrement sur le problème de la guanine, et mettant cette substance au contact d'une préparation hépatique de lapin capable de désaminer cette purine, il put mettre au point une technique de dosage de la guanine basée sur la mesure de l'ammoniaque formée sous l'action d'une quantité déterminée de cette enzyme extraite du foie de lapin.

En 1947, KALCKAR (56) (57), au cours de ses études sur le métabolisme des purines, put mettre au point une nouvelle méthode basée sur les modifications de leur absorption spectrale dans l'ultra-violet au cours de leur dégradation par des enzymes spécifiques. Reprenant les travaux de SCHMIDT (105), il étudia lui aussi les nouvelles possibilités offertes par la découverte de la guanase.

A partir de ces premiers travaux, purent commencer les recherches concernant l'enzyme elle-même. Cependant, il fallut attendre 1950 avec ROUSH et NORRIS (102) pour entrer dans la période des recherches sûres et précises. Reprenant les travaux de KALCKAR (55), ils simplifièrent et précisèrent sa méthode spectrophotométrique. Un réel progrès étant ainsi accompli, les travaux se multiplièrent démontrant la présence de guanase chez de nombreuses espèces du règne animal ou bien encore suivant les traces de ROUSH et NORRIS (102) pour étudier le rôle de la guanase dans certaines tumeurs.

En 1956, HUE et FREE (49) (50), WHITEHOUSE et SANTOS (124), d'une part, et GIUSTI et GALANTI (32), d'autre part, à la suite des observations de PASSANANTI cité par HUE et FREE (49) qui avait mis en évidence l'absence de guanase dans le sérum des sujets normaux, tandis qu'une activité relativement importante était décelable chez certains sujets atteints de troubles hépatiques, essayèrent de développer une technique de dosage simplifiée et facilement adaptable en clinique humaine, afin d'en faire un nouveau test pour la détection de l'hépatite virale. En France, ces travaux furent repris par BUDAN et RUSSE et WEILL (16) qui étudièrent l'activité des sérums d'un certain nombre de cas cliniques et de sujets normaux.

Concurremment, ces dernières années, les travaux devaient se multiplier pour essayer d'éclaircir le rôle de cette enzyme, l'accent étant plus particulièrement mis sur son rôle dans le développement de certaines tumeurs, son utilisation possible pour le diagnostic des hépatites virales et enfin son rôle éventuel au niveau des tissus nerveux. Toutes ces recherches ne constituent cependant que des lignes de conduite éventuelles, aucun travail d'ensemble ne paraît avoir été constitué jusqu'à présent, sa répartition générale chez les divers représentants du règne animal reste pleine d'incertitude et les différents rôles physio-pathologiques exacts sont encore à déterminer.

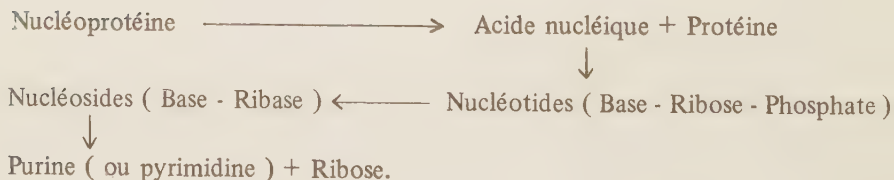
CHAPITRE II

APERÇUS SUR LE METABOLISME DES PURINES

Du point de vue biochimique, la guanase est une enzyme extrêmement importante puisqu'elle intervient directement dans le catabolisme des purines pour permettre la transformation de la guanine en xanthine. Or, nous savons qu'avec l'adénine, la guanine est une base purique extrêmement importante puisque l'on rencontre toujours l'une et l'autre dans tous les acides nucléiques. Nous voyons donc le lien important qui existe entre cette enzyme et le métabolisme du RNA et du DNA, le catabolisme de ces substances aboutissant à la libération de ces purines.

Le processus qui conduit à la dégradation des acides nucléiques peut être schématisé de la façon suivante :

SCHEMA N° 1



De même, on peut montrer la place occupée par les purines à l'origine de la chaîne métabolique de nombreuses substances. Grâce à l'administration par voie orale ou parentérale de composés puriques ou pyrimidiques marqués sur l'azote, on a pu étudier le sort métabolique de ces dérivés. Ainsi, si l'on donne à des rats ou des pigeons une ration alimentaire

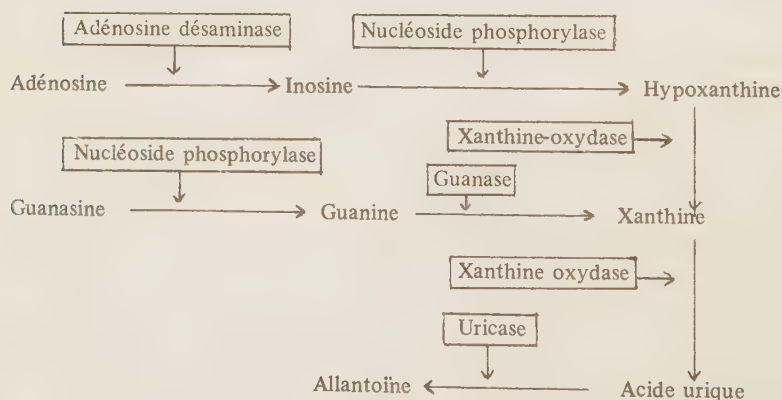
contenant de la guanine marquée, l'azote marqué se retrouve en grande quantité dans l'urine de ces animaux, soit incorporé à l'allantoïne chez le rat, soit à l'acide urique chez le pigeon. Par contre, cet azote n'apparaît pas en quantité dans les nucléoprotéines tissulaires. La guanine absorbée est donc, en grande partie catabolisée. Par contre, l'administration d'adénine marquée est suivie de l'incorporation d'azote marqué dans la guanine de l'organisme, ce qui montre bien que l'adénine est un précurseur de la guanine. Cependant, l'adénine n'est pas la seule origine de la guanine. En effet, l'ingestion de glycine marquée entraîne l'apparition de l'isotope marqué en grande quantité dans la guanine.

SCHMIDT (107), par l'importance des travaux qu'il publia dès 1928, fut, sans aucun doute, le grand précurseur quant à l'étude des purines. Ses travaux furent ensuite repris et complétés par de très nombreux auteurs et ainsi GREENSTEIN (35), en 1946, pouvait faire connaître le résultat de nombreuses recherches sur le métabolisme des acides nucléiques dans les tissus ; de même que RICHERT, en 1950 (99). Pour leur part, BLOCK, en 1954 (12), et de BERSAQUES, en 1967 (11) étudièrent plus particulièrement le métabolisme des purines et des pyrimidines au niveau de l'épiderme et aboutirent aux conclusions que nous allons voir tandis que T. TERRY HAYASHI et Coll., en 1963 (38) (39) précisaient le processus du métabolisme des purines au niveau du placenta.

Ainsi que l'a montré J. de BERSAQUES (11), la voie principale pour la formation des purines nucléotides débute à partir de petites molécules telles que glutamine, bicarbonate, formiate, glycine, aspartate et ribose-5-phosphate pour aboutir à la formation d'inosine-5-monophosphate. BARCLAY (4) a montré que la synthèse « *de novo* » des purines à partir de petits précurseurs s'effectuait surtout au niveau de l'intestin, tandis que la synthèse du RNA à partir de purines préformées se produit plus particulièrement au niveau du foie. Cependant, les observations de BLOCK (13) montrent la présence dans la peau du rat d'un système enzymatique très complet pour le catabolisme des purines et ont pu conduire l'auteur à faire des hypothèses sur le rapport existant entre la présence de ce système enzymatique et le rôle de la peau dans la synthèse de l'acide nucléique.

Au cours de la synthèse des purines nucléotides à partir de petits précurseurs, les nucléosides et les bases puriques ne sont pas des intermédiaires. Cependant, de nombreuses réactions enzymatiques impliquent la synthèse, l'interconversion ou la rupture de bases puriques, de nucléotides ou de nucléosides. J. de BERSAQUES (11) pense donc que certaines de ces réactions doivent être considérées comme des voies de secours permettant la réutilisation des purines. C'est ainsi que, comme l'a noté de LAMIRANDE (69), le métabolisme des purines dans les tumeurs est bloqué au niveau de la xanthine et de l'hypoxanthine puisqu'on n'y trouve ni xanthine oxydase ni uricase. On peut donc penser que dans ce cas ces métabolites seraient recyclés. Les réactions de rupture conduiront, elles, à l'acide urique qui est l'aboutissement normal du métabolisme des purines.

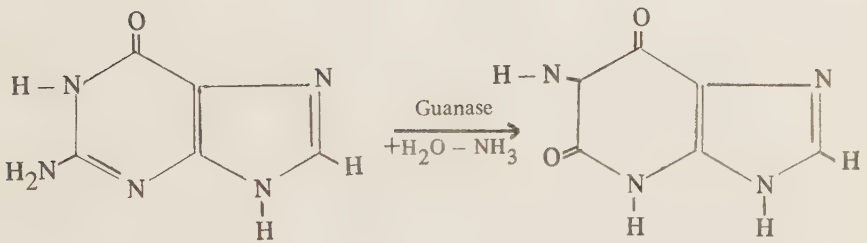
En dehors du cas des tissus tumoraux où, comme nous l'avons vu, la chaîne se trouve bloquée, le catabolisme des purines et des pyrimidines conduit toujours, grâce à l'action d'enzymes appropriées, à la formation de xanthine qui, finalement, donnera de l'acide urique chez l'homme et pour les mammifères inférieurs, la réaction se poursuivra pour aboutir à l'allantoïne.



SCHEMA N° 2

Nous pouvons donc situer la place importante que tient la guanase dans le métabolisme des purines. En agissant directement sur la guanine, elle permet le passage de celle-ci à la xanthine qui est, en quelque sorte, le maillon unitaire des deux voies du métabolisme des purines. La guanase, en présence d'une molécule d'eau, va arracher le groupement aminé de la guanine qui formera de l'ammoniaque et par acceptation d'un atome d'oxygène, on arrive à la xanthine.

FIGURE N° 1



CHAPITRE III

TECHNIQUE DE DETECTION ET DE DOSAGE

NATURE DU SUBSTRAT.

I - DETECTION ET DOSAGE.

Nous allons maintenant essayer de passer en revue d'une façon à la fois simple et précise les différentes techniques de dosage employées jusqu'à ce jour. Nous nous attarderons plus spécialement sur celles qui ont directement guidé nos recherches, résumant volontairement celle qui fut la base de notre travail et lui réservant une description plus détaillée dans la partie expérimentale de notre mémoire. Nous abandonnerons parfois l'ordre chronologique pour adopter une classification physico-chimique.

D'une façon générale, deux principes directeurs peuvent être retenus :

- Dans un premier cas, nous retiendrons que la dégradation de la guanine par la guanase s'effectue avec dégagement d'ammoniaque.
- Dans le deuxième cas, nous retiendrons que cette transformation de la guanine en xanthine s'accompagne d'une modification de l'absorption spectrale dans l'ultra-violet.

1 - Méthodes basées sur la détermination de l'ammoniaque formée :

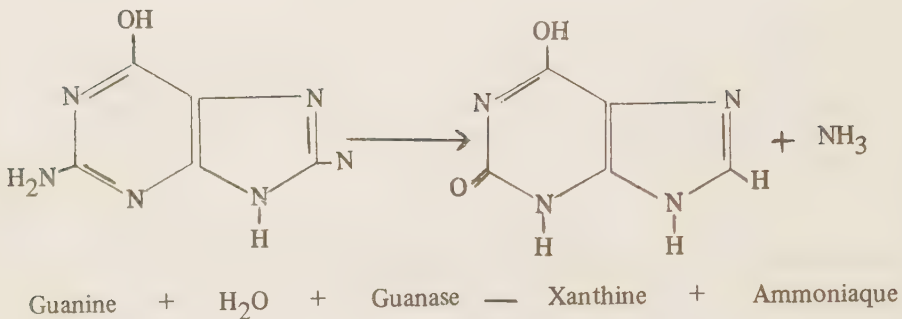
La plus ancienne technique de détection de la guanase est celle de SCHMIDT (105) et (106) qui remonte à 1932. Le problème à cette époque était de trouver une méthode de dosage des purines et en particulier de la guanine afin de pouvoir étudier plus facilement leur métabolisme.

Les méthodes proposées jusqu'alors consistaient essentiellement à isoler la guanine des tissus à étudier par une suite de traitements complexes, et à doser ensuite celle-ci par une réaction colorée appropriée. Mais comme le montrèrent HITCHINGS et FISKE (46), d'une part, et HITCHINGS lui-même (44), d'autre part, les méthodes d'isolement de la guanine n'étaient pas parfaites car il subsistait toujours certaines substances susceptibles, elles aussi, de réagir à la place de la guanine, la méthode étant, de ce fait, entachée d'erreurs. Ainsi, HITCHINGS et FALCO (45) constatèrent que l'iso-guanine et certaines ptéridines pouvaient être englobées dans cette méthode. Il était donc nécessaire de mettre au point une technique plus spécifique. Ce problème se posant d'une façon générale pour toutes les purines, SCHMIDT (107) introduisit pour la première fois, en 1928, une méthode enzymatique générale et spécifique.

Par la suite, poursuivant ses recherches après la découverte qu'il venait de faire d'une diastase capable de désaminer la guanine, SCHMIDT (106) adapta sa méthode enzymatique à l'étude de la guanase et proposa une technique qui devait ouvrir la voie à un nombre très important de travaux sur toutes les purines.

Cette méthode est entièrement basée sur le processus réactionnel de la guanase sur la guanine qui, comme nous l'avons déjà montré, se fait avec libération d'ammoniaque.

FIGURE N° 2



SCHMIDT (106) effectuait le dosage de l'ammoniac formé selon la technique de PARNASS (90). Plus récemment, cette méthode fut reprise par LINDHAL et SVARD (71) qui la comparèrent avec celle de ROUSH et NORRIS (102) que nous verrons ci-dessous.

- Une autre méthode toujours basée sur la mesure de l'ammoniac dégagé au cours de la réaction, fut signalée en 1952 par HIRSCHBERG, KREAM et GELLHORN (43). Ces auteurs ont réalisé des dosages de la guanase par détermination de l'ammoniaque selon la méthode de KJE-DAHL (SOBEL et MAYER) (110).

- En 1967, KUMAR, SANGER, TEWARI et KRISHNAN (63) signalent une autre technique qui consiste à mesurer l'ammoniaque formé selon la méthode des microcellules à diffusion de CONWAY (23). GIUSTI et GALANTI (33), après s'être livrés à des études comparées des différentes techniques de dosage de l'ammoniaque formé dans la réaction enzymatique de la guanase sur la guanine, ont pu conclure que seuls les dosages effectués selon la technique de CONWAY (23) étaient susceptibles de donner des résultats précis.

- Enfin en 1966, WENDEL T. CARAWAY (18), afin de mettre au point le dosage de l'activité guanase en clinique humaine, a essayé de développer une méthode colorimétrique simple, applicable au sérum humain. Ce nouveau procédé est basé sur la technique de détermination

de l'ammoniaque par le réactif phénate hypochlorite qui donne une coloration bleue proportionnelle à la quantité d'ammoniaque présente, cette coloration étant décelable à $630\text{ m}\mu$. Cette technique semble donner des résultats tout à fait satisfaisants.

Tout récemment, en 1968, NYSSSEN et DORCHE (87), reprenant les travaux de dosage de l'ammoniaque selon la technique d'ASSOUS (2) telle qu'elle est décrite par CARAWAY (18), mirent au point une méthode automatique de dosage de la guanase. Les auteurs purent conclure, après avoir étudié un assez grand nombre de cas cliniques, que cette nouvelle technique devait constituer un excellent test de cytolysé hépatique.

2 - Méthodes basées sur la détermination des modifications d'absorption spectrale dans l'ultra-violet :

Comme nous venons de le voir, jusqu'en 1947, les différentes techniques de dosage de la guanine d'une part et de l'activité guanasique d'autre part, étaient essentiellement basées sur la détermination chimique, volumétrique ou colorimétrique de l'ammoniaque dégagée au cours de la dégradation de la guanine en xanthine. Si certaines de ces méthodes présentaient l'avantage d'une précision relativement bonne, elles n'en demeuraient pas moins fort complexes et nécessitaient généralement un matériel encombrant. A l'exception de la méthode colorimétrique de CARAWAY (18) et de son adaptation par NYSSSEN et DORCHE (87), en effet, aucune des différentes méthodes proposées ne pouvaient être envisagées sur le plan clinique dans le cadre d'un dosage quotidien de routine. C'est pourquoi déjà, en 1947, KALCKAR (56) essaya d'apporter des précisions et des simplifications. Reprenant les observations de SORET (111) et de HARTLEY (37) sur la caractérisation des purines par leur intense absorption dans l'ultra-violet, entre $250\text{ m}\mu$ et $290\text{ m}\mu$, KALCKAR (57) mit au point une technique sur ce principe. Les travaux antérieurement effectués dans ce sens par HOLIDAY (48) d'une part et HEYROTH et LOOFBOUROW (42) d'autre part, avaient montré et confirmé que les rayons ultra-violet favorisaient la caractérisation des solutions pures de purine. En 1905, HARTLEY (37) étudiait déjà les différences d'absorption spectrale des uréides et de l'acide urique en relation avec leur couleur

et leur structure chimique. Malheureusement, cette méthode d'absorption directe était d'une valeur analytique limitée en raison de son manque de spécificité. KALCKAR (56) constatant que les purines et leurs dérivés présentaient à la même longueur d'onde des différences d'absorption, imagina de vaincre le manque de spécificité de l'étude des purines pures, en mesurant à longueur d'onde constante les différences d'absorption se produisant au cours de l'action d'enzymes spécifiques. L'auteur se heurta au fait que la transformation de la guanine en xanthine par l'action de la guanase n'entraînait pas de variation spectrale suffisante pour être décelée dans ses conditions d'expérience. Il écarta cette nouvelle difficulté en poussant la réaction par addition de xanthine oxydase au milieu réactionnel. La xanthine oxydase réagissait sur la xanthine résultant de l'action de la guanase sur la guanine et il se formait de l'acide urique qui entraînait, dans les conditions de l'expérience, une augmentation de l'extinction à 290 m μ et une diminution de celle-ci à 270 m μ .

Remarque.

L'auteur préconisait une déprotéinisation des tissus ou du plasma à analyser, soit par une solution de chlorure mercurique à la concentration de 5 % dans l'acide chlorhydrique, soit par l'acide perchlorique, comme le conseillent NEUBERG et STRAUSS (84). L'auteur déconseillait en outre totalement l'emploi d'acide trichloracétique qui présente une très forte absorption dans l'ultra-violet.

Discussion :

L'auteur lui-même signala le principal inconvénient de cette technique en raison de la possibilité d'une modification simultanée de la clarté optique de la solution qui pouvait soit augmenter, soit diminuer ou bien encore la possibilité d'une modification chimique entraînant une absorption indésirable.

Il faut noter, par ailleurs, les précautions importantes qui devaient être prises pour éviter l'apport de CO₂, ce qui aurait pu entraîner une acidification du milieu réactionnel.

Enfin, la complexité et le nombre même des opérations constituaient en soi une cause d'erreur qui ne pouvait être négligée.

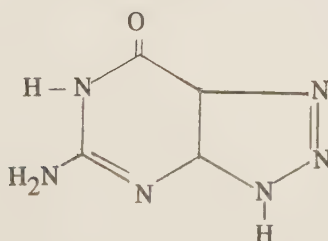
En conclusion, nous pensons que si cette méthode fut bien un réel progrès par la spécificité qu'elle assurait, elle n'en demeurerait pas moins entachée de nombreuses causes d'erreurs.

C'est seulement en 1950, avec les travaux de ROUSH et NORRIS (102) que fut proposée la première méthode simplifiée de dosage de l'activité guanase.

ROUSH et NORRIS (102), reprenant les travaux de KIDDER, DEWAY, PARKS et WOODSIDE (59) qui avaient constaté l'action antimétabolique de la 8-azaguanine et avaient voulu y voir la possibilité d'une action compétitive de cette substance sur le métabolisme des purines par blocage de leur désamination et leur oxydation par les enzymes. Ils se livrèrent à une étude comparative de la désamination par la guanase « *in vitro* », de la guanine et de la 8-azaguanine. Ils purent ainsi mettre en valeur un maximum d'absorption pour la guanine à 245 m μ à pH 6,0 alors que pour cette même longueur d'onde, la xanthine présentait un minimum très marqué. C'est donc sur ces bases que ROUSH et NORRIS (102) purent envisager une simplification de la méthode de KALCKAR (57).

FIGURE N° 3

La 8-azaguanine



Principe :

A une certaine quantité de substrat tamponné, on ajoute une quantité déterminée d'une solution enzymatique préparée selon un procédé basé sur

la méthode de KALCKAR (57) et le changement de densité optique est mesuré sur un spectrophotomètre. Par une simple lecture à 245 m μ , il devenait possible de mesurer à la fois la disparition de la guanine et l'apparition de xanthine, directement et sans avoir à ajouter de xanthine oxydase.

Discussion :

Cette méthode extrêmement simplifiée conservait cependant une cause d'erreur qui est la présence toujours possible de xanthine oxydase endogène. C'est pourquoi PASSANANTI, cité par HUE et FREE (50) mit au point une technique de dosage en anaérobiose. Quoiqu'il en soit et même si par la suite de nombreux travaux ultérieurs tels que ceux de LAMIRANDE et ALLARD (69) suivirent encore la méthode de KALCKAR (57), il n'en demeure pas moins que la technique de ROUSH et NORRIS (102) fut le point de départ d'un nouveau cycle de travaux sur la guanase. En particulier, dès 1952, HIRSCHBERG, GELLHORN et KREAM (43) la préconisaient et, plus récemment encore, cette technique allait être la base des recherches entreprises par HUE, FREE, WHITEHOUSE et SANTOS (124).

II - NATURE DU SUBSTRAT.

Nous avons déjà été amenés à parler d'une façon générale des différents substrats qui peuvent être utilisés lorsque nous avons passé en revue les différentes techniques employées pour le dosage de la guanine désaminase.

D'après les recherches que nous avons pu effectuer dans la littérature, deux substrats semblent avoir retenu l'attention des auteurs. Il s'agit principalement de la guanine et de la 8-azaguanine. Cependant, plusieurs recherches ayant été effectuées afin de déterminer quelle pouvait être l'action d'autres substances, notamment parmi les analogues structuraux, nous nous limiterons à étudier rapidement d'une part la guanine et la 8-azaguanine et, d'autre part, les autres substances, limitant volontairement l'étude de ces dernières à des résultats d'ordre général, des détails plus précis se trouvant rapportés dans le chapitre qui traitera des inhibiteurs.

En 1950, CARTER (20) étudia les différences d'absorption d'un certain nombre d'analogues structuraux de la guanine.

En 1966, ROY (103), le premier, se livra à une étude comparée et détaillée de l'activité de la guanase sur la guanine et sur la 8-azaguanine. Les résultats qu'il obtint, en parfait accord, avec ceux de ROUSH et NORRIS (102) confirmèrent tout à fait la possibilité pour la guanase d'accepter l'une ou l'autre de ces substances pour substrat. Mais le fait important à retenir de cette étude est la constatation que fit l'auteur de l'irréversibilité apparente de la désamination de la guanine. Par ailleurs, en 1967, les études très poussées auxquelles se livrèrent KUMAR et Coll. (63) pour tenter de localiser la guanase au niveau des différentes fractions cellulaires, permirent d'établir le fait que la guanine désaminase isolée de la fraction mitochondriale légère des cellules cervicales, n'agissait absolument pas sur la 8-azaguanine. En fait, comme nous le préciserons dans le chapitre qui traite de la nature de cette enzyme, plusieurs auteurs ont été amenés à envisager l'existence de plusieurs formes possibles, ayant toutes pour point commun leur action sur la guanine, alors que certaines de ces formes n'agissent pas sur la 8-azaguanine. CURRIE et Coll. (24) confirmèrent du reste tout à fait cette hypothèse, lorsqu'ils démontrèrent qu'en réalité, seule la guanine était détruite à 100 pour 100, tandis que la thioguanine n'était attaquée qu'à 0,75 pour 100. Nous constatons donc que la différence est considérable et permet de conclure à la spécificité d'action de la guanase sur la guanine.

Les analogues structuraux :

En 1966, ROY (103) établit que la guanine désaminase ne pouvait agir sur l'adénine ni sur la guanosine ni, enfin, sur l'acide guanylique. De même, l'auteur ne put déceler aucune modification de l'absorption optique avec la 2-aminopurine, la 2, 6-aminopurine et la 2-hydroxy-6-aminopurine. Il put ainsi énumérer quelques-unes des conditions indispensables qui devaient être remplies par le substrat pour pouvoir être métabolisé par la guanase. Les substrats doivent présenter un groupe amino et un carbone en 2 et un groupe hydroxylé et un carbone en 6. Les substrats avec une substitution en 9 ne sont pas valables.

En 1963, MANSOOR et Coll. (78) étudièrent l'action de la guanine désaminase sur un certain nombre d'analogues structuraux et purent établir de façon certaine la haute spécificité d'action sur la guanine. Par ailleurs, ils constatèrent que les 2-aminopurines n'étaient désaminées à aucun des pH optimum de la guanine. Aucune action ne put être décelée à pH 9 sur l'isoguanine (6-amino-2-oxypurine) et l'action enregistrée à pH 6,6 était si faible qu'elle pouvait être considérée comme nulle. Ils constatèrent enfin une faible action sur la 2-amino-6-mercaptopurine. Ces résultats montraient qu'un oxygène en 6 du noyau purique donne une activité maximum puisque son absence dans les 2-aminopurines se traduit par une activité minimum. De même, le remplacement de l'atome d'oxygène par un atome moins négatif (comme par exemple un soufre dans le cas des mercaptopurines) entraîne une diminution de l'activité. Les positions respectives du groupe aminé et de la fonction oxygénée sur le cycle purine semblent être capitales, puisque l'isoguanine s'avère être un très mauvais substrat.

Enfin, en 1967, CURRIE et Coll. (24) allaient confirmer ces résultats et les compléter. Ils insisterent en particulier sur la très grande importance des groupements 2, 6, 7 et 8 et constatèrent que la méthylation de la position 1 du cycle entraînait une diminution d'action tandis que la méthylation en 7 supprimait toute action. D'autre part, si on remplace la fonction —C— en 8 par un —N= , il y a une diminution d'activité.

CHAPITRE IV

PURIFICATION, ISOLEMENT ET CONSTITUTION DE L'ENZYME.

La préparation de guanase, protéine d'un poids Moléculaire variable de 170 000 pour une activité moyenne à 525 000 pour les activités les plus fortes d'après CURRIE, BERGEL et BRAY (24), fut exécutée à partir de tissus animaux pour la première fois en 1932 par SCHMIDT (106) qui venait de découvrir la présence de cette enzyme dans le foie des mammifères.

En 1944, HITCHINGS et FALCO (45) décrivirent à leur tour une méthode de purification de la guanase à partir du foie de lapin puis en 1947, KALCKAR (56) devait obtenir une préparation enzymatique purifiée à partir de foie de rat. En 1955, enfin, RAKOSKY (95) (96) prépara l'enzyme à partir de « *Clostridium Acidiurici* ».

Méthode de KALCKAR (96)

Le foie de rat, débarrassé de toute trace de sang, est mélangé dans deux volumes d'eau puis traité au mixer pendant quinze minutes. On procède alors à une première centrifugation à vitesse lente, 2 000 tours par minute pendant cinq minutes, puis sur le surnageant qui est à son tour centrifugé, cette fois à 15 000 tours par minute pendant 20 minutes à 0° C. Le liquide résultant de cette deuxième centrifugation est alors utilisé pour l'extraction de l'enzyme. On traite le surnageant par une solution saturée de sulfate d'ammonium pour amener la concentration à 0,4 de saturation. Il se forme un précipité que

l'on élimine par centrifugation. On traite à nouveau le surnageant par une solution de sulfate d'ammonium pour amener, cette fois, la concentration à 0,6 de saturation. Le second précipité obtenu est recueilli par centrifugation puis redissout dans une petite quantité d'eau où il est extrêmement soluble. On appelle cette solution la fraction « 0,4 à 0,6 ». L'enzyme peut alors être facilement séparée de cette fraction par précipitation fractionnée à l'alcool à 5° C. On amène le pH à 5,5 par addition de 0,3 volume de tampon succinate-acétate à pH 5,5. On ajoute de l'éthanol jusqu'à concentration de 15 %. Il se forme un précipité que l'on élimine. On ajoute à nouveau de l'alcool jusqu'à concentration de 40 % et on extrait le deuxième précipité avec de la glycine 0,1 M à pH 9,1 puis on centrifuge. Le surnageant contient alors 20 à 30 % de guanase.

Si cette méthode permet d'obtenir des extraits suffisamment actifs pour étudier les propriétés générales de l'enzyme, elle ne présente cependant pas toutes les finesses requises et ne permet pas d'obtenir l'enzyme isolée à l'état pur.

En 1954, par contre, RAKOSKY (95) obtint à partir de *Clostridium Acidiurici* une poudre suffisamment pure pour pouvoir être considérée comme l'enzyme isolée.

Une quantité aliquote de surnageant de culture est refroidie à la température de 1° C. On ajoute ensuite 400 ml d'un mélange alcool-éther préalablement refroidi à -25° C, ce qui abaisse la température de l'ensemble à -10° C qui est la température convenable. On ajoute ensuite un demi ml d'une solution saturée de chlorure de sodium et on laisse pendant une heure à -10° C. On procède alors à une centrifugation à 3 000 g pendant 20 minutes et à -10° C. Les tubes sont enfin immédiatement placés dans un dessicateur sous une pression de 1 cm de mercure. La poudre obtenue au bout de 18 heures constitue la préparation enzymatique purifiée.

Ces méthodes, pour intéressantes qu'elles soient, étaient toutes fort complexes pour ne permettre en fait l'obtention de préparations dont le degré de pureté était assez faible ou mal déterminé. En 1957, LINDAHL et SVARD (71) proposèrent une méthode rapide et simple en trois étapes pour obtenir la guanase à partir de peau de poisson.

La peau est enlevée immédiatement après la mort. L'ensemble, peau et écailles est broyé autant qu'il est possible, puis traité avec trois volumes d'eau glacée ou parfois avec une solution d'EDTA 0,01 M. L'extraction est ensuite complétée par un traitement de 30 minutes avec un agitateur. On centrifuge à 1 200 g pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu alors est, lui-même, centrifugé à 11 000 g pendant 20 minutes à 0° C. Le liquide obtenu contient l'enzyme suffisamment purifiée.

La possibilité d'utiliser l'EDTA pour cette extraction de l'enzyme constitue le point le plus original et le plus intéressant de cette technique. En effet, LINDAHL et SVARD (71) purent ainsi se rendre compte que l'enzyme extraite sous l'action de l'EDTA était beaucoup plus stable que l'enzyme extraite à l'eau. Ceci permit d'imaginer la présence d'ions dimétalliques qui inhiberaient naturellement l'enzyme. Cette hypothèse fut du reste confirmée par les expériences auxquelles se livrèrent les auteurs. Ils démontrèrent, en effet, que le cuivre et le zinc étaient particulièrement actifs, mais que l'inhibition qu'ils imposaient était facilement levée si, en même temps que ces ions ou avant, on faisait agir l'EDTA. Par contre, si l'EDTA était ajoutée après les ions inhibiteurs, il s'avérait impossible de lever leur action. Ce phénomène venant s'ajouter au fait que la valeur du pH jouait aussi un rôle, il était permis de penser qu'il pouvait y avoir un phénomène comparable à celui de la formation d'un sel complexe stable entre l'ion et l'enzyme.

En 1962, POLYAKOWA (93) et en 1963, TSUYUKI (120) isolèrent la guanase par électrophorèse. La première en opérant sur agar dans du tampon véronal à pH 8,6 et le second sur du gel d'amidon. Il fut ainsi possible de constater que l'enzyme migrait avec la fraction protéinique faiblement séparable et proche du point de départ. En 1967, KUMAR (63) compléta ces études électrophorétiques par des études immunochimiques et put ainsi établir que l'enzyme isolée de la fraction mitochondrique légère était distincte de l'enzyme « B » isolée du surnageant.

En 1963, MANSOOR, KALYANKAR et TALWAR (78) reprirent sensiblement les premiers points de la technique de KALCKAR (57) qui, à la suite de traitements successifs de l'homogénat par du sulfate d'ammonium à 40 %, puis à 60 % et centrifugation, conduisait à une fraction suffisamment riche en guanase pour permettre son extraction par l'alcool. Mais au lieu de

procéder à un fractionnement alcoolique, ces auteurs introduisirent une nouvelle purification supplémentaire en traitant la fraction 2 par un gel de phosphate de calcium préparé selon la technique de KEILIN et HARTREE (58) Ceci permettait d'obtenir une fraction 3 qui était traitée à nouveau par le sulfate d'ammonium et après centrifugation, on obtenait la fraction 4. Celle-ci devait elle-même être finalement purifiée par absorption sur de la cellulose DEAE à pH convenable.

MANSOOR et KALYANKAR (78) purent ainsi obtenir une enzyme purifiée pour la première fois, jusqu'à 80 fois, ce qui allait permettre aux auteurs de se livrer à des études précises sur l'enzyme ainsi isolée et de conclure à sa très grande stabilité puisque son activité n'était nullement perturbée par les différents traitements de la purification.

Plus récemment, en 1966, ROY (103) obtient une préparation enzymatique à partir du muscle de morue. Sa technique en trois étapes lui permettra d'obtenir un extrait enzymatique dont le degré de pureté était augmenté jusqu'à 200 fois.

Toutes les opérations sont menées entre 0° C et - 3° C. Le muscle de morue est congelé puis homogénéisé dans deux volumes d'eau distillée. Une centrifugation de dix minutes à 15 000 tours par minute permet d'obtenir un surnageant ou « *enzyme crue* », qui est filtré sur la laine de verre. L'auteur constata que le fait de pratiquer l'homogénéisation dans une solution isotonique et tamponnée à 0,15 M de KCl, n'augmente absolument pas l'activité enzymatique du produit final. La solution homogénéisée puis centrifugée est rapidement portée à une température de 5° C par immersion des tubes à centrifugation en plastique dans un bain-marie à 60° C. pendant une minute puis on refroidit rapidement. On peut alors éliminer les protéines dénaturées grâce à cette opération par une centrifugation de dix minutes à 15 000 tours par minute. Puis le surnageant est fractionné par le sulfate d'ammonium sans avoir à ajuster le pH à la neutralité puisque ceci n'entraîne aucune modification de l'activité. Comme KALCKAR et MANSOOR (57) (77), l'auteur constatant que l'activité enzymatique était essentiellement concentrée dans la fraction précipitante entre 40 et 60 % de saturation. Cette fraction est donc recueillie par centrifugation et dialysée pendant quatre heures pour éliminer le sulfate d'ammonium qui est un inhibiteur de l'activité guanasique. Les protéines ainsi précipitées sont éliminées par une dernière centrifugation

et la solution restante constitue la préparation enzymatique qui sera utilisée pour les réactions.

ROY (103) préconisait ensuite une dernière purification par passage sur une colonne de DEAE ou par électrophorèse sur gel d'amidon selon la méthode de TSUYUKI (120).

Dernièrement, en 1967, KUMAR et TEWARI (67) proposèrent une méthode originale qui devait permettre d'obtenir une enzyme purifiée 20 à 25 fois et dont le degré de pureté était d'environ 40 %.

KUMAR (65) opère à partir de la fraction mitochondrique légère du cerveau de rat qui sédimente entre 5 000 et 15 000 g. Celle-ci est remise en suspension dans 100 ml de milieu saccharosé puis traitée par du Triton X 100 (à 10 % v/v) jusqu'à obtention d'une concentration finale de 1 %. Cette suspension est ensuite abandonnée deux heures à basse température, ce qui donne la «Fraction I ». Par une suite de précipitations au sulfate d'ammonium et une élution finale dans du tampon Tris 0,1 M, pH 8,0, on obtient la «fraction IV ». Celle-ci est mise en suspension avec du gel d'alumine C γ , abandonnée une heure à basse température et enfin centrifugée. Le surnageant, « Fraction V », représente la préparation enzymatique purifiée.

Enfin, dernièrement, en 1967, CURRIE et BERGEL (24) publièrent une méthode complexe mais précise, d'isolement de la guanase.

Ces auteurs préconisent l'utilisation de foie de lapin qui semble être particulièrement riche en guanase. L'organe ayant été homogénéisé, l'homogénat est centrifugé à 41 000 g pendant vingt minutes puis le surnageant est relargué par une suite de traitements au sulfate d'ammonium et de dialyses dans des conditions très précises. L'enzyme est ensuite absorbée sur du gel de phosphate de calcium. Le gel est remis en suspension après lavage puis il est procédé à un nouveau relargage et une nouvelle dialyse. L'opération se termine par une adsorption sur de la cellulose DEAD et du Sphadex G 200. Ceci permet d'obtenir une guanase qui est purifiée 200 fois avec un rendement de 20 %. CURRIE et BERGEL (24) purent ainsi faire l'étude des propriétés de l'enzyme ainsi obtenue et constatèrent qu'il existait certaines différences au point de vue cinétique, entre l'enzyme obtenue à partir de muscle de morue par ROY (103), celle obtenue à partir de cerveau de rat par MANSOOR (78) et celle obtenue à partir de foie comme ils le préconisent.

CHAPITRE V

REPARTITION DE L'ENZYME.

Nous allons maintenant envisager les travaux relatifs à la répartition de la guanine désaminase. Nous étudierons tout d'abord la répartition chez les invertébrés puis chez les vertébrés et nous envisagerons ensuite la localisation intra-cellulaire de cette enzyme.

I - CHEZ LES INVERTEBRES.

a) Chez les micro-organismes :

BARKER et BECK (5), en 1941, montrèrent que « *Clostridium acidurici* » et « *Clostridium cylindrosporum* » étaient capables de désaminer la guanine, la xanthine, l'acide urique et l'hypoxanthine. Il leur parut cependant un peu hâtif de conclure à la présence de guanase et il fallut de nouveaux travaux plus approfondis pour y parvenir. En 1950, BECK (8) établit de façon certaine la conversion de guanine en xanthine par « *Clostridium acidurici* ». Mais la preuve de la présence de guanine désaminase n'était toujours pas faite et c'est seulement en 1954 que RAKOSKY et BECK (95) firent la preuve de la présence de guanase au niveau de cette bactérie. Par la suite, en association avec ZIMMERMAN (96), ils purent donner une technique d'isolement et de caractérisation. De même, RASHBA (98) mit en évidence la guanase au niveau de certaines bactéries.

En 1956, RABINOWITZ et BARKER (94) identifièrent la guanase au niveau de « *Clostridium cylindrosporum* ».

En 1954, ROUSH (100) avait pu mettre en évidence la présence de guanase chez certaines levures adaptées du genre « *Torula* ».

Enfin, en 1957, ZAKHAROVA (125), rechercha et mit en évidence certaines désaminases dont la guanase, au niveau de « *Salmonella typhimurium* ».

b) Chez les mollusques :

En 1956, SHUZO ISHIDA (109) rechercha la guanase chez un certain nombre de pélecypodes marins, *Anadra inflata*, *Meretrix meretrix lusona*, *Venerupis philippinarum*, *Ostrea gigas* et *Mitilus edulis*. Il ressort de cette étude que la guanase paraît très répandue chez les pélecypodes et il est possible de la retrouver de façon universelle dans tout leur organisme. Une activité particulièrement importante fut relevée chez les lamellibranches, au niveau de la « mid gut gland », exception faite toutefois pour *Meretrix meretrix lusona*, chez qui cette glande est parfaitement dépourvue d'activité. Au contraire, l'activité guanine désaminasique est extrêmement forte chez *Ostrea gigas* et d'une façon générale, elle est toujours au moins dix fois plus forte dans la « mid gut gland » que dans tous les autres organes.

En 1963, FARINA (29) étudia les activités enzymatiques d'un céphalopode, *Octopus vulgaris* et y décela la présence de guanase au niveau de l'hépatopancréas. On sait, en effet, depuis les travaux de DASTUGUE (25) combien l'hépatopancréas des céphalopodes et plus particulièrement dans le genre « *Helix* » est particulièrement riche en substances enzymatiques, nous n'avons cependant relevé aucune recherche concernant la présence de guanase chez l'escargot.

c) Chez les insectes :

En 1953, ANDERSON (1) signala la présence de guanase chez le « ver armé » *Prodenia eridiana*, le « ver de farine » *Tenebrio molitor* et le « cafard » *Periplaneta americana*.

En 1959, LISA et LUDWIG (73) la mirent en évidence chez le cafard commun *Leucophaea maderae* et PIERRE (91) prouva que les nymphes de cet insecte dépendaient de leurs symbiontes pour leur activité guanasique.

Enfin, en 1967, BUENGENER (17) étudia les activités enzymatiques d'homogénats de sang d'animaux infectés par certains parasites et après y avoir décelé une activité guanase, put mettre en évidence la présence de guanase chez certains de ces parasites eux-mêmes isolés du sang. C'est ainsi que l'activité est élevée pour *Plasmodium vinckei* et *Plasmodium berghei* de la souris et pour *Plasmodium berghei* du rat.

d) Chez les crustacés :

La littérature ne nous fournit que de très rares renseignements sur la présence de guanase chez les crustacés. Cependant, en 1956, ROUSH et BETZ (100) mirent en évidence la présence de guanase dans l'hépatopancréas du homard *Homarus americanus* et chez la langouste.

II - CHEZ LES VERTEBRES INFERIEURS.

Comme nous l'avons déjà vu, la guanine est une purine du métabolisme des acides nucléiques, aussi la trouve-t-on en assez grande quantité dans la peau et les écailles de poisson, ce qui leur vaut cet aspect argenté caractéristique de certaines espèces comme le montrèrent HITCHINGS et FALCO en 1944 (45) et NECKEL en 1954 (83). En 1944, SUMMER (113) avait montré, par ailleurs, que la production et le catabolisme de la guanine des écailles de poisson étaient influencés par des stimuli visuels. Ainsi, un séjour prolongé à l'obscurité entraîne-t-il une diminution du taux de la guanine alors que la lumière, au contraire, augmente ce taux. Les poissons sont donc apparus à LINDAHL et SVARD (71) comme très intéressants pour y étudier l'enzyme du métabolisme de la guanine. LINDAHL (71) fit ses expériences sur le gardon *Leuciscus rutilus* et put démontrer la présence de guanase dans la peau de ce poisson.

Dès 1958, les observations de TARR (117) nous ont appris qu'avec les purines nucléosides phosphorylases du muscle de morue qui utilisent la guanosine pour substrat, il se forme de l'ammoniaque due à la désamination de la guanine. Ayant observé, en outre, la présence de xanthine et l'absence de guanine, ROY (103) supposa la présence dans le muscle de morue, de

guanine désaminase. Il la mit en effet en évidence et parvint même à l'extraire et à la purifier jusqu'à 200 fois.

III - CHEZ LES MAMMIFERES.

a) Dans l'espèce humaine :

Le premier bilan sur la répartition de la guanine désaminase dans l'espèce humaine fut réalisé en 1963 par LEVINE (70) qui dressa un tableau extrêmement complet de sa répartition au niveau de la plupart des organes. LEVINE (70) établit un classement d'après lequel on pouvait considérer trois catégories d'organes :

- Le groupe « HAUT » comprenant : le cerveau, le foie, l'intestin grêle et les reins, avec des taux de 300 à 2 500 UI/mg de poids frais ;
- Le groupe « INTERMEDIAIRE » avec l'estomac, le pancréas et la rate qui donnent des taux de 80 à 200 UI/mg de poids frais ;
- Le groupe « BAS » avec des taux de 0 à 60 UI/mg de poids frais, comprenant les ganglions lymphatiques, les surrénales, le coeur et les tissus cancéreux.

En 1954, PAGE (88) notait déjà le rôle important joué par le placenta dans la synthèse des composés biologiques. En effet, en plus de son rôle dans le transport des aliments, nous savons que le placenta est aussi le site privilégié du métabolisme de certaines substances et, outre un grand nombre d'autres enzymes, HAYASHI (39) y mit en évidence deux désaminases : la guanase et l'adénine désaminase. Or KYANK (68) a montré en 1955 qu'on ne trouvait pas de xanthine oxydase au niveau du placenta. Il semblerait donc que le placenta formerait en permanence de la xanthine et de l'hypoxanthine qui passeraient ensuite dans la circulation générale, pour être seulement ensuite métabolisées au niveau du foie. Cependant, aucune observation sur le taux de ces substances dans le sang des femmes enceintes n'a été faite jusque là.

En outre, HAYASHI (39) n'a noté aucune différence entre les placentas prématurés et les placentas à terme.

Enfin, en 1967, de BERSAQUES (11) a montré dans l'épiderme humain la présence d'un assez grand nombre d'enzymes du catabolisme général parmi lesquelles la guanase. Ceci permet de mieux comprendre le renouvellement continu des cellules de l'épiderme qui suppose une synthèse et une utilisation rapide et très active des acides nucléiques, nucléaires et cytoplasmiques. Ces observations sont en parfait accord avec les travaux de BLOCK (13) qui avait fait les mêmes observations sur la peau du rat.

b) Chez les autres mammifères :

TALWAR (114) en 1961, étudia l'activité guanine désaminasique chez le rat. En résumé, on peut dire que chez cet animal, les organes qui ont la plus forte activité guanasique décelable sont les suivants : le cerveau le foie, le coeur, les reins, les poumons et la rate. D'autre part, BLOCK (12) (13) et JOHNSON (55) ont montré que la peau du rat est riche en cette enzyme.

Mais particulièrement intéressant est le taux de guanase mis en évidence dans le cerveau. Normalement, le catabolisme des purines se situe entièrement dans le foie. Pour la guanase, ça n'est pas à proprement parler le cas puisqu'on la trouve en très grande quantité dans le cerveau qui, pour de nombreuses espèces animales, se trouve être l'organe le plus riche et de loin. Or, déjà en 1957, THOMAS (118) avait noté la présence de guanase dans le cerveau de rat puis LEVINE (70) l'observa chez la souris et le hamster et MANSOOR (77) pour sa part, a noté que l'activité guanasique du cerveau de singe était deux fois plus élevée que celle du foie. On doit aux travaux de MANSOOR (78) et surtout de NORSTRAND (86) de connaître la répartition détaillée de l'activité guanasique au niveau des différentes parties du cerveau. On trouve une activité croissante en s'élevant dans les différents niveaux du cerveau, avec une activité très nette dans le diencéphale et particulièrement le thalamus. Dans les hémisphères cérébraux où l'activité est la plus élevée, le maximum fut noté dans l'aire septale et la matière grise de la partie antérieure du lobe temporal tandis que l'activité minimum était relevée dans la matière blanche et les lobes pariétaux et occipitaux. L'activité est relativement élevée dans le corps strié et elle est relativement basse dans le pallidum. La glande pituitaire contient une très petite quantité d'enzymes, de même que la glande pinéale qui demeure donc remarquable par les taux très

faibles d'enzyme que l'on y trouve. NORSTRAND (86) pense qu'une corrélation peut être vue entre la distribution enzymatique et le rôle des neurones dans le fonctionnement des membres. Tous ces résultats sont en parfait accord avec ceux trouvés par PALLADIN (89) qui note, lui aussi, la plus forte activité dans la matière grise.

Ces études ne simplifient malheureusement pas la connaissance du rôle possible de cette enzyme, elles sont cependant en accord avec les observations de nombreux auteurs. En effet, THRELFALL (119) avait noté le taux important de guanine nucléotide dans le cerveau (18 à 20 % du total des nucléotides) et leur taux très faible dans les muscles (3 % seulement). HEALD (41) pour sa part avait remarqué que le 32 P était incorporé aux guanines nucléotides avant son incorporation à l'ATP dans les circonvolutions cérébrales lorsque celles-ci étaient soumises à des stimulations électriques. La guanine semble donc avoir un « Turn-Over » extrêmement actif et, peut-être, joue-t-elle un rôle important dans le cerveau. De toute façon, la grande spécificité de l'enzyme laisse supposer qu'il y aurait libération de guanine libre par les cellules du cerveau. Or TALWAR (116) et CHITRE (21) ont montré la déplétion en RNA du cerveau au cours des convulsions, tandis que HYDEN (51) et VRBA (121) faisaient la même observation au cours d'exercices fatigants. GEIGER (30) pour sa part, a aussi noté que la teneur en cytidine et adénine des acides nucléiques, augmente par rapport à celle de la guanine et de l'uridine dans le cerveau du chat, au cours de stimulations. Les résultats expérimentaux restent toutefois actuellement insuffisants pour attribuer une fonction, si toutefois elle en a une, à la guanine désaminase. Il faut, cependant, noter que la guanase produit de la xanthine dont le pH de solubilité en milieu physiologique est plus élevé que celui de la guanine. Or POLIS (92) a montré que la xanthine augmentait la quantité d'oxygène retenue par les cellules du cerveau autant que la phosphorylation oxydative et nous savons, d'autre part, grâce aux travaux de RAPPOPORT (97) et WESTERFIELD (123) qu'il n'y a pas de xanthine oxydase au niveau du cerveau. Nous ne pouvons terminer cette étude sans mentionner les travaux de NEUHOFF (85) qui constata une déplétion de 4 % de la guanine dans le cerveau de lapin après traitement par du LSD.

Très intéressante aussi est la teneur en cette enzyme du sang. Le sérum, pour sa part, ne présente que peu ou pas d'activité guanase tandis

que les globules rouges ont, selon les espèces, soit une activité extraordinairement élevée, soit au contraire totalement nulle. C'est ainsi que BOWKIEWICZ SURMA (14) et BASTIDE (6) ont montré la forte activité de celle-ci chez le rat et LEVINE (70) l'a aussi noté chez la souris et le hamster ; par contre, LEVINE (70) n'a relevé aucune activité chez le chien, le lapin et l'homme.

TABLEAU N° 1

VARIATIONS DU TAUX DE GUANINE DESAMINASE EN FONCTION DE L'ESPECE ET DES DIFFERENTS TISSUS (D'après LEVINE) (70)

L'unité choisie est la quantité qui catalyse la transformation de 1 μ mole de guanine par minute à 37° C et à pH 7,5, exprimée en milli-unités par gramme de tissu frais.

Espèces	Globules rouges	Coeur	Foie	Cerveau
Souris	5 130	220	790	1 100
Rat	5 610	590	1 580	1 190
Hamster	6 540	200	460	2 440
Chien	0	240	7 900	
Homme	0	0	1 480	1 300
Lapin	0	0	460	370

III - LOCALISATION INTRACELLULAIRE.

En 1952, STERN (112) étudia la composition des nucléi isolés et des préparations cellulaires des tissus de veau, de boeuf, de cheval et de volailles. Il constata que la guanase se trouvait en grande quantité dans la plupart des nucléi. Il n'est, cependant, pas possible de considérer que cette enzyme soit nécessaire à leur bon fonctionnement puisqu'elle n'est pas réellement présente dans tous les nucléi, encore que dans les nucléi de foie de cheval et de rat, on ne trouve que de la guanase.

En 1958, de LAMIRANDE (69) situe toute l'activité du foie de rat dans le surnageant de 140 000 g.

Pourtant, en 1959, JORDAN (53) estime que les deux tiers seulement de l'activité guanasique des homogénats de rat se retrouvait dans le surnageant de centrifugation à 140 000 g.

En 1962, MANSOOR (77), pour sa part, remarquait que la guanase du cerveau de singe était principalement localisée dans le surnageant de 50 000 g.

En fait, KUMAR (66) l'a montré en 1965, le fractionnement différentiel permet de mettre en évidence une activité guanasique nettement plus importante que celle trouvée sur l'homogénat total. La distribution de la guanase dans les tissus des mammifères ressemble en de nombreux points à celle de la pyridoxalphosphokinase et aussi un peu à celle de la ribonucléase. La guanine désaminase du cerveau et du foie de rat est répartie entre toutes les fractions subnucléaires : nucléi, mitochondries lourdes, mitochondries légères, microsomes et fluide surnageant. Mais la plus forte activité pour le foie et pour le cerveau se trouve dans la fraction soluble cytoplasmique. D'autre part, de tous les composants particuliers, les mitochondries légères qui sédimentent entre 5 000 g et 15 000 g constituent la plus riche fraction. En outre, tous les culots de centrifugation à l'exception des microsomes, ont une activité guanasique plus forte après traitement par du Triton X 100.

Il semblerait donc que la guanase, associée au matériel particulier, existe partiellement sous sa forme libre et le reste sous forme « d'enzyme latente ».

En 1966, KUMAR (67) constata que l'activité des mitochondries légères était augmentée non seulement par l'action du Triton X 100, mais aussi par tous les traitements qui entraînaient une désintégration de ces particules. Comme l'activité enzymatique était entièrement retrouvée dans le surnageant de 140 000 g , l'auteur conclut à la solubilité de cette enzyme.

En fait, comme l'avait déjà supposé KUMAR en 1965 (66), l'enzyme associée à des particules présente des différences avec l'enzyme soluble. De fait, en 1967 (63), l'auteur constata qu'il était possible de séparer l'enzyme du surnageant de 15 000 g en deux fractions distinctes « A » et « B » par chromatographie sur colonne. Or, si les études immunochimiques, électrophorétiques et cinétiques ne permettaient pas de distinguer ces deux formes, il existait des différences notables entre la forme « B » et l'enzyme isolée des mitochondries légères.

Il semble donc établi que la guanine désaminase fasse partie du groupe des enzymes qui existent sous plusieurs formes « iso », différentes selon leur localisation subcellulaire. Il est, en outre, tout à fait remarquable que ces différences ne se rencontrent pas seulement d'une fraction subcellulaire à l'autre, mais encore d'une espèce animale à l'autre et mieux d'un organe à l'autre.

Enfin, en 1969, KUMAR (64) a observé l'évolution de la distribution de la guanase avec l'âge. Jusqu'à l'âge de quinze jours, on trouve la guanase dans le surnageant de 5 000 g après quoi elle apparaît dans les fractions cellulaires et mitochondriques pour atteindre un maximum de trente jours. Il n'y a aucune activité dans les fractions nucléaires jusqu'à quinze jours.

CHAPITRE VI

PROPRIETES DE LA GUANINE-DESAMINASE CINETIQUE ENZYMATIQUE

Ce chapitre est consacré à l'étude des principaux facteurs que l'on peut qualifier de physiques et qui, pour une valeur donnée, ont une influence sur la réaction d'hydrolyse de la guanine désaminase.

I - INFLUENCE DU pH.

D'une façon générale, on peut dire que la guanase a son pH optimum situé dans la zone de la neutralité. En fait, une étude plus approfondie de la littérature sur ce sujet, montre très vite que ce dernier peut varier de 4,5 à 11,5. Dans le tableau N° 1, nous avons regroupé les différentes valeurs optimum de pH, étudiées par différents auteurs, telles que nous avons pu les recueillir dans la littérature. En nous référant à l'exposé de ce tableau, nous constatons que ROUSH et NORRIS (102), en 1950, trouvèrent des pH différents selon qu'ils prenaient la guanine ou la 8-azaguanine pour substrat. Cependant, le fait que la présence de guanine inhibait la désamination de la 8-azaguanine dans une zone de pH commune aux deux substrats, prouvait suivant toute vraisemblance qu'il s'agissait cependant de la même enzyme.

En 1963, MANSOOR (78) établit la preuve que la guanase extraite du foie de rat différait de celle extraite du cerveau de ce même animal, par les valeurs optima de pH. En effet, s'il trouvait deux valeurs optima de pH pour le cerveau, il n'en trouvait plus qu'une pour le foie. Cependant, les taux de dénaturation par la chaleur étant les mêmes pour les deux valeurs, il ne fut pas possible de se prononcer sur la signification de ce phénomène et il supposa que les

deux activités s'exerçaient sur une seule et même protéine. En outre, cet auteur constata des différences selon les animaux, les pH pour un organe donné n'étant pas forcément les mêmes.

En fait, en 1966, ROY (104) montra que le chauffage à 50° C supprimait l'une des deux valeurs du pH et prouva ainsi qu'il y avait sûrement deux enzymes différentes, ou, tout au moins, une activité enzymatique quasi-identique ayant pour substratum deux molécules protéiniques légèrement différentes, ce qui est le propre des iso-enzymes. De fait, en 1967, KUMAR (63) comme nous l'avons déjà signalé, put séparer l'enzyme du cerveau en deux parties « A » et « B » distinctes et put prouver par des études immuno-chimiques et électrophorétiques que l'enzyme de la fraction mitochondrique légère était distincte de l'enzyme « B » du surnageant. Une distinction entre les deux formes « A » et « B » du surnageant reste moins certaine. En outre, il est intéressant de noter que l'enzyme de la fraction mitochondrique légère du cerveau n'agit pas sur la 8-azaguanine. (Tableau N° 2, page).

En fait, il est important de noter que les résultats varient beaucoup en fonction de la qualité du tampon utilisé et de sa concentration.

II - INFLUENCE DE LA NATURE DU TAMPON ET DE SA CONCENTRATION.

En 1950, ROUSH et NORRIS (102) insistaient sur le fait que l'absorption spectrale variait avec le pH.

En 1957, LINDAHL (71) constata que le pH optimum de la guanase de peau de gardon était très différent selon que les mesures étaient effectuées dans du tampon Tris ou dans du tampon phosphate. Mieux, cet auteur constata que plus la concentration du tampon phosphate était élevée, plus le pH optimum de la réaction se rapprochait de la zone d'acidité pour arriver finalement à un pH de 7,5 pour une concentration de 0,1 M.

TABLEAU N° 2

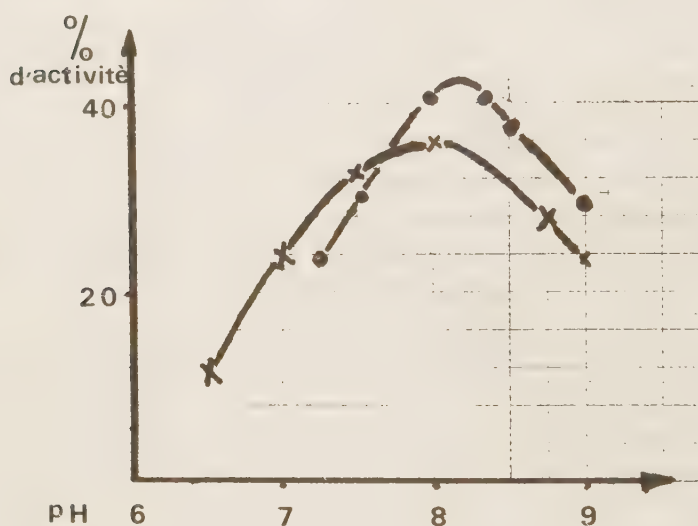
LES GUANINES DESAMINASES ET LEURS pH OPTIMUM

Sources	Substrat	pH optimum	Références
Foie de rat	Guanine	9,0	Schmidt (107)
Foie de rat	8-azaguanine	6,5	Roush (102)
Foie de rat	Guanine	9,0	Roush (102)
Foie de lapin	8-azaguanine	5,9	Currie (24)
Foie de lapin	1-méthyl-guanine	7,1	Currie (24)
Foie de lapin	Guanine	7,1	Currie (24)
Muscle de morue (enzyme crue)	Guanine	5,6 - 8,5	Roy (103)
Muscle de morue (enzyme purifiée)	Guanine	6,0	Roy (103)
Cerveau de rat	Guanine	9,0 - 6,6	Mansoor (78)
Cerveau de mouton	Guanine	8,5 - 6,5	Mansoor (78)
Cerveau de singe	Guanine	6,5 - 9,0	Mansoor (77)
Peau de gardon	Guanine	7,5	Lindahl (71)
Cerveau de rat - Mitochondries légères	Guanine	7,5	Kumar (63)
- Surnageant * enzyme A	Guanine	6,0	Kumar (63)
* enzyme B	Guanine	8,0	Kumar (63)
<i>Clostridium acidurici</i>	Guanine	8,0	Rakosky (96)
Sérum	Guanine	7,5	Hue (49) (50)
Sérum humain	Guanine	6,45 à 8,10	Caraway (18)

COURBE N° 1

D'après LINDAHL (74)

Influence du tampon sur la courbe d'activité en fonction du pH :



. ——— . : tampon Tris 0,05 M
 x ——— x : tampon phosphate 0,067 M

Valeurs données pour cinq minutes d'incubation.

Pour sa part, HUE (50) préconisait l'emploi du tampon borate plutôt que le tampon phosphate en raison du rôle inhibiteur de la xanthine oxydase exercé par le tampon borate.

Cependant, KUMAR (66) ne remarque aucune différence entre les résultats obtenus en présence de tampon Tris et en présence de tampon véronal.

III - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT :

De nombreux auteurs ont étudié l'influence de la concentration en substrat et ont établi la relation qui existe entre celle-ci et la rapidité de la réaction selon la méthode de LINEWEAVER et BURK (72).

Cependant, la constante de Michaelis (K_m) calculée graphiquement par cette méthode donne des résultats très différents selon les auteurs.

En fait, ces différences ne peuvent être prises en considération car les méthodes de travail sont, elles aussi, très différentes. On note, en effet, des différences quant au substrat, au pH, au degré de pureté de l'enzyme.

Il faut, par contre, noter que les auteurs s'accordent pour constater que la vitesse de la réaction augmente avec la concentration en substrat, dans une certaine marge tout au moins.

LEVINE et HALL (70) montrèrent que la densité optique augmentait de façon linéaire avec la concentration en 8-azaguanine, ce qui établissait de façon évidente que le taux de la réaction était directement proportionnel à la concentration en substrat.

JOSAN et KRISHNAN (54) établirent que le rapport qui existait entre la rapidité de la réaction et la concentration en substrat se traduisait par une courbe sigmoïde.

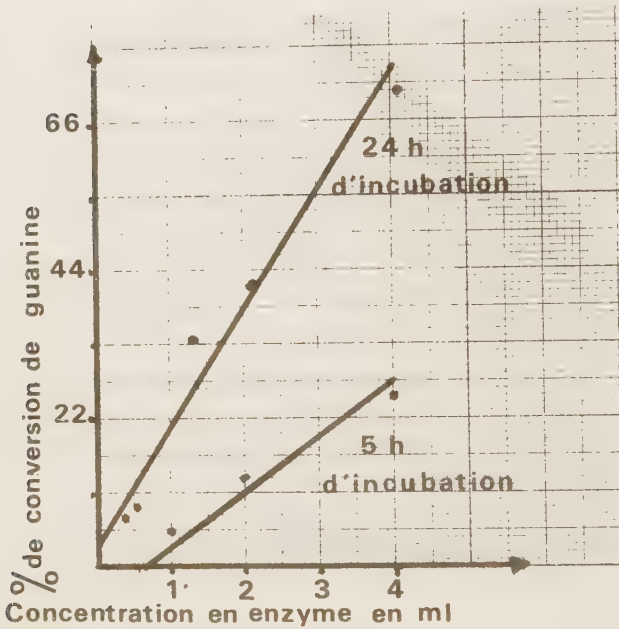
CARAWAY (18), enfin, fit des essais avec des solutions de guanine de 0,1 - 0,2 - 0,3 - et 0,4 mg par ml et ne constata pas de modification sensible des résultats, par contre, NYSSSEN et DORCHE (87) estiment que les fortes concentrations en guanine (supérieures à 0,4 mg par ml) inhibent totalement l'activité enzymatique.

IV - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME :

RAKOSKY (95) a montré par des expériences s'étendant sur une période d'incubation de 5 h à 24 h que les taux de conversion de la guanine en xanthine étaient liés par une relation linéaire à la concentration en enzyme du milieu réactionnel.

COURBE N° 2

EFFET DE LA CONCENTRATION EN ENZYME SUR L'ACTIVITÉ
(d'après RAKOSKY)



ROY, en 1965 (103), a montré que la fraction dialysée « sulfate d'ammonium », perd 67 % de son activité par une préincubation de 5 h et demie à 35° C et que les extraits purifiés sur colonne de cellulose DEAE perdent 35 % dans les mêmes conditions.

CARAWAY, en 1966 (18), a montré une perte de 10 % de l'activité par une préincubation de trente minutes à 56° C.

Pour sa part, KUMAR (67) a noté une inactivation totale de l'enzyme de cerveau de rat par un traitement de cinq minutes à 50° C.

Il ressort de l'ensemble de ces observations que la guanase est très sensible à l'action de la chaleur, mais une fois de plus, nous devons constater des différences notables entre les résultats des différents auteurs. Ces différences sont imputables d'une part au degré de pureté de l'enzyme utilisée dans chaque cas et attire d'autre part une fois de plus notre attention sur les différences qui semblent exister entre les différentes guanases selon leurs origines.

V - INFLUENCE DE LA DUREE DE LA REACTION :

Dès 1955, RAKOSKY (96) avait montré qu'à température constante, 40° C, l'activité tombe rapidement au bout de deux heures, l'enzyme étant probablement inactivée au bout de cette période. En 1966, CARAWAY (18) nota que la réaction était linéaire pendant une période de deux heures. Et, enfin, pour sa part, NYSSSEN (87), en 1968, fit mention d'une assez bonne linéarité pour une période d'une heure.

CHAPITRE VII

EFFECTEURS ET INHIBITEURS.

Outre les différents facteurs que nous venons de passer en revue au cours de l'étude des propriétés de la guanine désaminase, il existe un certain nombre de substances capables d'activer ou d'inhiber son action. La connaissance de ces substances présente un double intérêt. En effet, du point de vue analytique il est important de connaître les produits susceptibles d'influencer la réaction dans un sens ou dans l'autre, mais d'autre part, du point de vue biologique, la connaissance de ces substances est de nature à permettre une meilleure compréhension du rôle physiologique de cette enzyme et même du rôle que certains de ces inhibiteurs pourront éventuellement jouer en pathologie.

I - ACTIVATEURS.

En 1951, les travaux de KIELLY (60) puis en 1953 ceux de HOGEBOOM (47) avaient montré que certaines activités enzymatiques des fractions mitochondriques des cellules, possédaient une action latente. En 1956, WATTIAUX et de DUVE (122) montrèrent que les activités des phosphatases acides, de la ribonucléase, de la désoxyribonucléase, de la b β ta glucuronidase ou de la cathepsine, pouvaient être fortement augmentées par l'action d'un détergent, le Triton X 100.

En 1957, LINDHAL et SVARD (71) constatèrent que pour pH 8, la courbe d'activité de la guanase en fonction du temps n'était pas linéaire et que à pH 9,0 l'enzyme semblait totalement inhibée. Or l'addition de EDTA au milieu réactionnel, faisait disparaître ces phénomènes. La courbe d'activité devenait linéaire pour tous les pH et une activité d'environ 85 % de la valeur maximum était relevée à pH 9,0. Ces auteurs avaient donc mis en évidence le pouvoir activateur de l'EDTA. Ces constatations amenèrent LINDAHL et

SVARD (71) à étudier l'effet des ions divalents et ils s'aperçurent ainsi que l'action activatrice de l'EDTA était probablement due à la formation de chélate entre cette substance et les ions divalents inhibiteurs naturellement contenus dans la solution d'extraction de l'enzyme.

En 1960, BENDALL et de DUVE (9) poursuivant les travaux de WATTIAUX (122) démontrèrent que l'activation des « enzymes latentes » des fractions mitochondriques ne pouvait s'expliquer que par l'augmentation de la perméabilité de la membrane des mitochondries, voir même par sa destruction, ce qui avait pour conséquence soit de permettre une pénétration du substrat dans la particule, la réaction étant alors réversible, soit une libération de l'enzyme, la réaction étant de ce fait irréversible. Ces auteurs démontrèrent ainsi que, non seulement des substances détergentes, comme le Triton X 100, étaient susceptibles d'activer ces réactions enzymatiques, mais que tous les traitements qui entraînaient une destruction plus ou moins totale de la membrane donnaient le même résultat. C'est ainsi le cas pour le gel et le dégel successif et, brutal, pour le choc osmotique, voire même aussi pour l'action de certaines enzymes. De DUVE et WATTIAUX (122) prouvèrent ainsi que les enzymes qui réagissaient de cette façon se rencontraient dans plusieurs sites intracellulaires. Reprenant ces observations en 1965 et en 1966, KUMAR (67) montra que lorsque l'on soumet les fractions mitochondriques légères du cerveau de rat, naturellement riches en guanase, à un traitement par le Triton X 100 ou une désintégration par un moyen physique quelconque, on pouvait obtenir une augmentation de 50 % de l'activité guanasique.

II - EFFECTEURS ALLOSTÉRIQUES :

En 1968, VEENA JOSAN (54) montra que dans le foie de rat, la guanase se trouvait régulée par GPT. Or la guanine n'est pas synthétisée comme telle, mais elle se forme à partir de GMP qui provient lui-même tantôt du catabolisme de IMP, tantôt de la destruction des acides nucléiques. Il est donc possible d'imaginer que la désamination enzymatique de la guanine puisse être une forme de régulation de la concentration des guanine-nucléotides « *in vivo* » : L'activation de la guanine aminohydrolase par GPT permettrait de réduire de moitié la concentration de substrats nécessaire.

Nous sommes donc en présence d'un phénomène de régulation par effet allostérique, la GPT est donc un activateur allostérique de la guanase. On ne peut, en effet, trouver aucune relation structurale entre l'effecteur, GPT, et le substrat de l'enzyme, la guanine, et c'est bien un des produits terminaux de la chaîne qui contrôle lui-même par action sur le premier enzyme, le système enzymatique qui procède à sa formation.

III - INHIBITEURS.

Afin de faciliter cette étude, nous distinguerons essentiellement deux catégories d'inhibiteurs. D'une part, les inhibiteurs que nous qualifierons de chimiques et, d'autre part, un inhibiteur particulier qui se rencontre naturellement dans l'organisme.

a) Inhibiteurs « chimiques » :

Dès 1932, SCHMIDT (106) faisait déjà état du pouvoir inhibiteur du fluorure de sodium à l'égard de la guanine désaminase. Pourtant, il fallut attendre 1957 avant que soient entreprises des recherches systématiques. Comme nous l'avons vu plus haut, à cette époque, LINDAHL (71) avait mis en évidence le pouvoir de l'EDTA. Il en vint donc naturellement à étudier les effets des cations divalents sur cette activité enzymatique. Il montra que, parmi un certain nombre d'ions essayés, Cu^{++} et Zn^{++} possédaient de loin le pouvoir inhibiteur le plus élevé, cette inhibition étant levée par la présence d'EDTA. En outre, l'auteur essaya d'autres corps parmi lesquels le fluorure de sodium, mais contrairement aux résultats obtenus par SCHMIDT (106) et RAKOSKY (96), il ne releva aucun pouvoir inhibiteur pour ce corps dans les conditions d'expérimentation. Par ailleurs, l'iodoacétate ne possédant aucun pouvoir inhibiteur à la concentration de 0,01 M, on peut affirmer qu'il ne se produit aucune interaction entre les ions inhibiteurs et les groupes sulfhydryls de l'enzyme. Enfin, l'ammoniaque à la même concentration ne donne, lui non plus, aucune inhibition. Il résulte donc des observations de LINDAHL (71), que la présence de certains ions ne semble pas nécessaire au bon déroulement de la réaction, contrairement à ce qu'avait supposé SCHMIDT (106) et que, au contraire, certains ions divalents semblent avoir un pouvoir inhibiteur assez élevé. Ces résultats furent par la suite confirmés par les travaux de ROY (103)

D'autre part, ayant remarqué le lien étroit qui existait entre le pouvoir inhibiteur des ions étudiés et le pH de la solution, LINDAHL (71) envisagea la possibilité de formation de sels complexes entre ces cations et les charges négatives de la molécule enzymatique, ces complexes étant parfaitement stables.

En 1966, ROY (103) nota une inhibition de 45 % avec le cyanure de sodium à 10^{-1} M, 75 % d'inhibition avec le fluorure de potassium à 10^{-2} M et une inhibition totale avec le p-hydroxymercuribenzoate à 10^{-4} M. Au contraire, il ne put relever aucun effet inhibiteur avec l'iodoacétate à 10^{-3} M, ni avec le sulfate d'argent à 10^{-5} M. En outre, ROY (103) ne releva aucune inhibition par le sulfate de cuivre à pH 6,0 jusqu'à une concentration de 10^{-5} M, mais ce résultat ne doit pas être regardé comme en contradiction avec ceux trouvés par LINDAHL (71) puisque cet auteur avait constaté que le pouvoir inhibiteur de ce sel allait en augmentant avec le pH pour devenir total à pH 9,0, alors qu'il était pratiquement nul à pH 7,3. Enfin, l'action inhibitrice due aux cyanures étant assez faible, il n'y a pas lieu de penser qu'il puisse se produire de combinaisons entre les cyanures et des ions métalliques essentiels.

Parmi les inhibiteurs « chimiques », il y a lieu de considérer certaines substances qui ont plus particulièrement été étudiées à des fins thérapeutiques, ce qui nous conduira à envisager les analogues structuraux à la guanine et ses dérivés par substitution. Nous passerons ainsi des inhibiteurs non compétitifs aux inhibiteurs compétitifs, proprement dits.

En 1950, ROUSH (102) avait déjà constaté que l'administration de guanine inhibait la désamination de la 8-azaguanine. En 1954, CARLO (19) puis en 1957, MANDEL (74) (75) constatèrent que l'administration simultanée de 8-azaguanine et de 4-amino-5-imidazole-carboxamide, se traduisait par une augmentation de la toxicité de la 8-azaguanine. Ils prouvèrent alors que ce phénomène s'expliquait par une inhibition de la guanase qui ne pouvait plus métaboliser la 8-azaguanine. En fait, le pouvoir carcinostatique de la 8-azaguanine a donné lieu à de très nombreuses études sur les analogues structuraux de la guanine et ses dérivés. BAKER (3) semble avoir fait les études les plus poussées dans ce sens. Cependant, afin d'éviter une énumération fastidieuse, nous allons essayer de résumer l'essentiel de ces phénomènes à travers les travaux les plus marquants que nous avons relevé dans la littérature.

Comme le montra ROY (103) en 1967, il est assez surprenant de constater que tous les analogues structuraux de la guanine ne sont pas des inhibiteurs de la guanase. La 2-chloro-6-hydroxypurine est déchlorurée pour donner de la xanthine ; la 2-hydrazino-6-hydroxypurine et la 2-méthylamino-6-hydroxypurine donnent, elles aussi de la xanthine sous l'action de la guanase et, pourtant, ces substances ne sont pas des inhibiteurs compétitifs. De même, est-on surpris que l'hypoxanthine ne soit pas non plus inhibitrice. En fait, ces phénomènes ne peuvent s'expliquer que par l'existence et la prédominance de formes tautomères. Il faut, en fait, connaître le mécanisme de réaction de la guanase sur la guanine pour comprendre quels doivent être les sites actifs de la molécule, sur lesquels les substitutions pourront entraîner une inhibition. ROY (103), MANSOOR (78), CURRIE (24) et BAKER (3) les ont cités. La nature du groupement en 6 du cycle purique est essentielle pour l'action de l'enzyme. Le remplacement de l'oxygène par un atome moins négatif, comme le soufre, entraîne une diminution de l'activité. Les groupes, -2, -6 et -7 sont donc les plus importants. En outre, une méthylation de la position - 1, entraîne une diminution de l'activité et les substitutions en -9 ne sont pas valables. Pour BAKER (3), il est très probable que les hydrogènes en -1 et en -9 de la guanine soient complexés à l'enzyme comme électrons accepteurs, alors que l'oxygène -6 et l'azote -7 sont complexés sous forme d'électrons donneurs. Il semble, d'autre part, que la liaison π et le groupe 2-NH₂ de la guanine ne soit pas complexés à l'enzyme. Enfin, il est possible que l'azote -3 soit complexé à l'enzyme sous forme d'électron donneur. On peut donc dire en résumé que l'hydrogène -1, l'hydrogène -9, l'azote -7 et l'oxygène -6 constituent les sites actifs d'inhibition de la guanine désaminase. L'azote -3 pourrait lui aussi être un site d'inhibition mais cela n'est pas évident.

(Tableau N° 3 et Tableau N° 4).

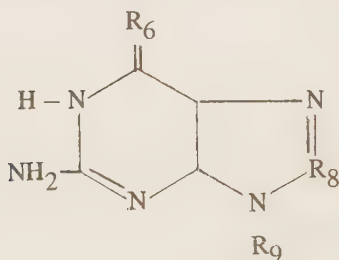
TABLEAU N° 3

INHIBITION DE LA GUANINE-DESAMINASE PAR LES
ANALOGUES STRUCTURAUX :

Analogues	Concentration μM	% d'inhibition
Xanthine	500	0
2-Aminoimidazole-4-carboxamide	28	50
3-Aminopyrazole-4-carboxamide	500	0
2-6-diaminopurine	300	0
2-amino-6-méthylthioguanine	250	0
1-méthyl-guanine	125	Substrat
9-méthyl guanine	275	50
7-méthyl guanine	250	0

TABLEAU N° 4

INHIBITION DE LA GUANINE DESAMINASE PAR LES DERIVES
DE SUBSTITUTION DE LA GUANINE.



R ₆	R ₈	R ₉	Concentration y M	% d'inhibition
0	CH	H	13,3	Substrat
0	N	H	200	Substrat
S	CH	H	100	Substrat
0	CBr	H	250	0
0	COH	H	250	0
0	C ₆ H ₅ C	H	250	50
0	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₃ C	H	250	0
0	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂	H	175	11
0	CH	n-C ₅ H ₁₁	450	50
0	CH	i-C ₅ H ₁₁	210	50
0	CH	CH ₂ CH (CH ₃)C ₂ H ₅	200	50
0	CH	Cyclohexyl	125	50
0	CH	C ₆ H ₅ CH ₂	370	50
0	CH	p-ClC ₆ H ₄ CH ₂	350	50
0	CH	2 - Furfuryl	320	50
0	CH	C ₆ H ₅	10	50
0	CH	p-ClC ₆ H ₄	3,8	50
0	N	p-ClC ₆ H ₄	18	50
S	CH	C ₆ H ₅	83	50

Mentionnons, enfin, les récents travaux de CHOI et CHANG-HEUNG (22), en 1968, qui mirent en évidence « *in vitro* » l'effet inhibiteur de la guanine désaminase par la 6-mercaptopurine et par le 5-fluorouracyl, ces phénomènes étant particulièrement intéressants pour les effets thérapeutiques de ces substances.

b) Inhibiteurs « naturels » :

C'est en 1965 que KUMAR, TEWARI et KRISHNAN (63) et (65) qui étudiaient la répartition cytotologique de la guanase dans le cerveau de rat, mirent en évidence la présence d'un inhibiteur « naturel ». Par fractionnement très poussé, des homogénats de cerveau, ces auteurs s'aperçurent que la somme des activités des différentes fractions résultant des centrifugations, était considérablement plus importante que l'activité de l'homogénat total. Il fallait donc bien admettre qu'il existait dans l'homogénat total un inhibiteur qui ne devait pas se trouver dans chacune des fractions considérées isolément. Principalement mis en évidence dans la fraction mitochondrique lourde, l'inhibiteur fut aussi décelé dans la fraction nucléaire.

Le surnageant S_1 de la centrifugation à 5 000 g qui possède une très forte activité est, en partie, inhibé lorsqu'il est mélangé avec un peu de la fraction nucléaire.

Le surnageant S_2 qui résulte d'une centrifugation de une heure à 15 000 g est, en partie, inhibé par l'addition d'une partie de n'importe quel culot de centrifugation. Si l'on mélange S_2 avec la somme des trois fractions particulières, on obtient une inhibition de 40 %.

Les fractions mitochondriques lourdes sont donc caractérisées par leur aptitude très grande à inhiber l'activité guanasique des surnageants. Si on traite ces fractions par du Triton X 100, puis une ultra centrifugation et enfin des chocs par les ultra-sons, on s'aperçoit que le surnageant qui en résulte est doué d'une très forte activité inhibitrice à l'égard de S_2 , celle-ci pouvant aller jusqu'à 60 % tandis que les mitochondries elles-mêmes n'ont plus aucun pouvoir inhibiteur. L'inhibiteur « naturel » est donc soluble. En outre, tout comme la guanase elle-même, l'inhibiteur des fractions mitochondriques lourdes, semble donc exister sous forme libre et sous forme latente, alors que l'inhibiteur des fractions nucléaires ne semble exister que sous la forme latente.

En 1967, KUMAR et Coll. (63) identifièrent cet inhibiteur dans d'autres tissus du rat. Il le mirent ainsi en évidence dans les fractions mitochondriques lourdes des reins et du foie, mais, par contre, aucune inhibition ne fut relevée dans les fractions particulières de la rate. Au niveau du cerveau, l'inhibiteur se trouve essentiellement condensé dans le cervelet. Or, l'inhibiteur du rein n'agissait pas sur l'enzyme du surnageant de foie et de cerveau. De même, l'inhibiteur du cerveau n'agissait pas sur le surnageant du rein et enfin l'inhibiteur isolé du foie, au contraire, agissait parfaitement sur l'enzyme extraite du cerveau et du rein. D'autre part, l'enzyme extraite de la fraction mitochondrique légère s'avéra insensible à l'action de l'inhibiteur isolé de la fraction mitochondrique lourde.

En tout état de cause, le rôle physiologique de cet inhibiteur n'est pas clair. On sait que dans le cerveau, il est uniquement concentré au niveau du cervelet, mais sa localisation au niveau du rein n'a pu encore être précisée. Il y a en outre de sérieuses raisons de penser que les enzymes et les inhibiteurs isolés des reins, du foie et du cerveau sont différentes. Quoiqu'il en soit, la présence dans les mitochondries lourdes du cerveau, d'un inhibiteur, est tout-à-fait significative d'un délicat mécanisme régulateur du métabolisme du cerveau. Il est, par ailleurs, intéressant de noter que les travaux de KUMAR (65) en 1965, ont montré que l'inhibiteur purifié était susceptible d'inhiber d'autres enzymes, notamment la xanthine oxydase, l'uricase et la succinoxydase. Par contre, il n'agit pas sur la phosphoglucomutase, la catalase, l'hexokinase, la glucose-6-phosphate et 6-phospho-gluconique acide deshydrogénase.

Poursuivant ses recherches sur cet inhibiteur, en 1969, KUMAR (64) étudia son apparition avec l'âge et constata que la fraction mitochondrique lourde et la fraction nucléaire n'avaient aucun pouvoir inhibiteur jusqu'à l'âge de quinze jours. Jusqu'à cet âge, l'inhibiteur n'existe donc pas ou, s'il existe, il est inactivé.

Enfin, KUMAR (65) et Coll. ont isolé l'inhibiteur du cerveau de rat et ont précisé sa nature. Il est insoluble dans l'eau, mais soluble dans une solution de chlorure de sodium à 1 % ou dans un tampon Tris 0,1 M à pH 8,0.

On peut le précipiter par l'acide trichloracétique à 5 %, il est inactivé par la chaleur à 50° C et n'est pas dialysable. Enfin, il présente l'absorption caractéristique des protéines entre 245 m μ et 340 m μ avec un maximum pour 275 m μ . Cet inhibiteur semble donc être une protéine thermolabile, elle est stable plusieurs jours à - 16° C en solution dans du tampon Tris.

CHAPITRE VIII

ROLE PHYSIO-PATHOLOGIQUE.

A la lumière de nos recherches bibliographiques, nous allons maintenant essayer de dégager l'importance de cette enzyme. Dans une première partie, nous envisagerons le rôle physiologique possible et dans une deuxième partie, nous verrons l'intérêt qu'a pris l'étude de cette enzyme en pathologie ces toutes dernières années.

I - ROLE PHYSIOLOGIQUE -

La guanase est une enzyme particulièrement intéressante puisque son substrat, la guanine, est métaboliquement le précurseur de la xanthine, et ainsi directement une source d'acide urique. Cependant, si l'on considère généralement que le catabolisme des purines s'effectue principalement dans le foie, en ce qui concerne la guanase, il a été prouvé qu'elle était particulièrement active en d'autres points de l'organisme.

En 1952, STERN (112) put mettre en évidence de grandes quantités de guanine désaminase dans la plupart des nucléi. Il est pourtant impossible d'affirmer que cette enzyme soit indispensable à leur bon fonctionnement, puisqu'elle n'est pas réellement présente dans tous les nucléi. Il est toutefois troublant de constater que dans les nucléi de foie de cheval et de rat, on ne trouve que de la guanase. Il semble qu'en fait il ne faille pas voir une relation directe de cause à effet, entre le taux d'une enzyme dans un tissu et son activité dans les nucléi correspondants.

En 1954, BLOCK (12) mit en évidence la guanase au niveau de la peau de rat. Cette enzyme venant s'ajouter à un grand nombre d'autres catalyseurs découverts au niveau de l'épiderme, BLOCK et JOHNSON (13) virent une relation entre ces activités enzymatiques de la peau et son rôle dans la synthèse des acides nucléiques. Cependant, l'activité xanthine-oxydase y est seulement 10 à 20 % de celle de la guanase et de l'adénine désaminase. Si ces résultats sont bien le reflet de l'activité métabolique de la peau, une telle distribution pourrait se traduire par une accumulation de composés puriques intermédiaires. Ces composés pourraient alors constituer un pool utilisable pour la synthèse de l'acide nucléique et ensuite son incorporation dans des nucléoprotéines. Cependant, les travaux de GETLER (31), ayant montré que la xanthine oxydase ne peut pas être incorporée dans l'acide nucléique des tissus, il n'est pas possible de trouver une solution par les voies normales connues de la synthèse des acides nucléiques. En 1967, de BERSAQUES (11), à la suite des recherches qu'il fit sur l'épiderme humain, conclua lui aussi qu'il n'était pas possible, dans l'état actuel de nos connaissances, de spéculer sur ces résultats.

Le rôle de la guanase mise en évidence par HAYASHI (38) (39) au niveau du placenta n'a pu, lui non plus, être élucidé jusqu'à ce jour. En effet, si BRODY (15) a vu que le taux de DNA et de RNA augmente dans ce tissu au moment de la croissance, on possède peu de renseignements en ce qui concerne la synthèse et la dégradation des dérivés nucléotidiques. Or, KYANK (68) ayant montré l'absence de xanthine oxydase au niveau du placenta, il semblerait que ce tissu formerait en permanence de la xanthine et de l'hypoxanthine qui passeraient dans la circulation générale, pour être seulement ensuite métabolisée au niveau du foie. Cependant, aucune observation sur le taux de ces substances dans le sang des femmes enceintes, n'a été faite jusque là.

Au niveau du foie, où, comme nous l'avons vu, l'activité guanasique est très grande, il est facile de saisir l'importance de la place occupée par cette enzyme dans la chaîne du métabolisme des purines et, pourtant, là non plus, il n'est pas possible de préciser son rôle. Toutefois, les travaux de BARCLAY (4) ont montré que si la synthèse « *de novo* » de purines à partir de petits précurseurs, prédomine au niveau de l'intestin, au contraire l'utilisation préférentielle de purines préformées, pour la synthèse du RNA s'effectue dans le

foie. D'autre part, TALWAR (115) a montré que l'administration d'hormone de croissance à des rats entraînait une augmentation de leur taux de guanase hépatique. Enfin, JOSAN (54) a constaté que l'administration de GPT active la guanase hépatique du rat « *in vitro* ».

Plus nombreuses ont été les recherches effectuées au niveau cervical. Dès 1954, SCHMIDTZ (108) mit en évidence la présence de guanine-nucléotides au niveau du cerveau. Puis THRELFALL (119) prouva que 18 à 20 % des nucléotides du cerveau sont des guanines nucléotides. D'emblée, l'accent était donc mis sur la guanine et laissait donc supposer la présence de guanine désaminase en grande quantité, ce qui fut montré dès 1959 par JORDAN (53) qui s'étonnait de la grande quantité de guanase qu'il décela au niveau du cerveau des rongeurs et tout comme TALWAR (114), en 1961, devait conclure que le rôle de cette enzyme n'était pas clair. En 1965, la découverte par KUMAR (63) et (65) d'un inhibiteur naturel dans les mitochondries du cerveau de rat, mit en évidence de façon significative un délicat mécanisme régulateur du métabolisme du cerveau, mais aucune explication ne pouvait être donnée. Nous ne pouvons cependant pas terminer ce chapitre sans mentionner un certain nombre d'observations qui, sans apporter une solution, pourraient comme le nota MANSOOR (78), être le point de départ d'une explication possible de la fonction de cette enzyme au niveau du cerveau si toutefois elle en a une. Outre les observations de THRELFALL (119) sur le taux des guanines nucléotides du cerveau, HEALD (38), pour sa part, a noté que, au cours de stimulations électriques des circonvolutions cérébrales, le ^{32}P était incorporé aux guanine-nucléotides avant son incorporation à l'ATP. La guanine semble avoir un turn-over extrêmement rapide, or la grande spécificité de l'enzyme laisse supposer qu'il y aurait libération de base libre par les cellules. Intéressante aussi est la déplétion en RNA du cerveau observée par TALWAR (116) et CHITRE (21) au cours des convulsions et par HYDEN (51) et VRBA (121) durant les exercices fatigants. GEIGER (31) rapporte aussi que la teneur en acides nucléiques en cytidine et adénine des acides nucléiques, augmentant en même temps que celles de guanine et uridine.

D'autre part, la guanine désaminase produit de la xanthine dont le pH de solubilité en milieu physiologique est plus élevé que celui de la guanine. Or POLIS (92) a montré que la xanthine augmentait la quantité d'oxygène

retenue par les mitochondries du cerveau, autant que la phosphorylation oxydative. Il est intéressant de rapprocher ces observations de celles de RAPPO-PORT (97) et de WESTERFIELD (123) qui ont montré l'absence de xanthine-oxydase au niveau du cerveau. On peut donc supposer qu'un recyclage des purines du pool des nucléotides pourrait s'effectuer à ce niveau, par analogie avec les réactions similaires des autres tissus.

Une autre voie reste possible pour tenter d'éclaircir le rôle de la guanase, c'est celle de l'étude de certaines réactions pathologiques.

III - ROLE EN PATHOLOGIE -

a) Parasitologie :

BUENGENER (17) a étudié un certain nombre d'activités enzymatiques, parmi lesquelles la guanase, dans des homogénats de sang de souris infestées par *plasmodium Berghei*, *plasmodium Vinckei*, *trypanosoma Brucei* et *erythrozoon Coccoides*. Ayant constaté certaines perturbations, le parasite était ensuite isolé des globules rouges et l'activité guanasique y était déterminée. Elle s'est révélée élevée pour *plasmodium Vinckei* et *plasmodium Berghei* de souris et pour *plasmodium Berghei* de rat.

b) Pathologie hépatique :

En 1962, PASSANANTI, cité par HUE et FREE (50) constata que l'activité guanasique était élevée dans le sérum des patients atteints d'hépatite virale, alors que l'on trouvait très peu et même pas du tout de guanase chez ceux qui avaient une cirrhose ou une jaunisse obstructive et aucune activité n'était relevée dans le sérum des sujets normaux.

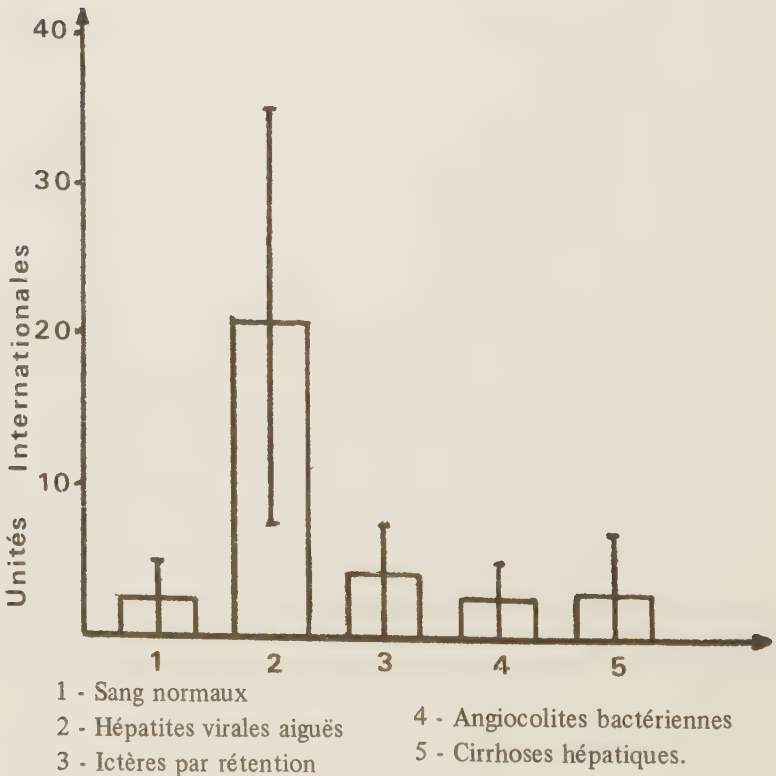
A la suite de cette observation, dès 1964, de nombreuses recherches furent faites afin d'exploiter ce phénomène dans le diagnostic de l'hépatite virale. Aux Etats-Unis, HUE et FREE (49) et (50) et KNIGHTS (61) mirent au point une technique de dosage qui devait faciliter la recherche de la guanase pour en faire un test hépatique, mais ne purent se prononcer sur

la valeur de ce test. En France, BUDAN et RUSSE et WEILL (16) étudièrent un certain nombre de cas cliniques, mais le dosage de l'activité guanase du sérum ne leur parut ni suffisamment fidèle, ni suffisamment sûr pour supplanter les tests actuellement en usage. De même, MUSSER (82) en 1966, ne pense pas que la guanase apporte un complément d'information dans les troubles hépatiques, par rapport aux autres enzymes déjà connues.

Au contraire, les italiens GIUSTI et GALANTI (32) (34) jugèrent ce test comme extrêmement intéressant et montrèrent même qu'il était, sans doute, le test le plus significatif dans les cas d'hépatite virale.

FIGURE N° 4

ACTIVITE GUANASIQUE DU SERUM DANS DIFFERENTES
HEPATITES (d'après GIUSTI) (32)



En 1967, SANDRA Mc LOED (80) fit une étude comparative des différents tests hépatiques possibles et estima que la recherche de la guanase sérique devait avoir sa place par les tests hépatiques et qu'elle pouvait même donner des indications quantitatives sur le taux de dégradation des cellules hépatiques. Ceci se trouve parfaitement en accord avec les récents travaux de NYSSSEN et DORCHE (87) qui constatèrent au cours de l'hépatite virale une augmentation constante de la guanase sérique chez l'homme, pour atteindre finalement un taux de 20,2 UI/litre. Des déterminations répétées au cours de la maladie, permettent même de suivre son évolution. A l'inverse, tous les auteurs s'accordent à ne constater aucune modification au cours de l'hépatite chronique et le taux de guanasémie reste très faible au cours de la lithias cholédocienne ou de la compression pancréatique. De même, en 1968, KONTTINEN (62) et en 1970, BEL (8) ne remarquèrent aucune modification significative de la guanasémie chez les alcooliques chroniques.

Par ailleurs, de très nombreuses observations ont montré que l'intoxication par les poisons hépatiques entraînait une nette augmentation de la guanasémie. BOWCKIEWCZ SURMA (14) montra que le tétrachlorure de carbone entraînait une augmentation de la guanase sérique et BASTIDE (6) montra que l'intoxication au nitrate d'uranyle s'accompagnait d'une nette élévation de la guanase au niveau des érythrocytes et d'une baisse simultanée de cette activité au niveau des reins. Plus récemment, en 1970, BELLE et Coll. (8) ont précisé que la guanase n'était pas en excès dans le sérum au cours de la phase métabolique précytolytique de l'intoxication aiguë expérimentale au tétrachlorure de carbone.

Enfin, GIUSTI (33) nota une forte élévation dans le sérum des rats et des souris intoxiqués par le virus MVH 3.

c) Rôle dans le cancer :

Le rôle de la guanase dans le cancer a été soupçonné très tôt puisque, dès 1947, KIDDER (59) montrait l'action carcinostatique de la 8-azaguanine puis, ayant constaté que certaines tumeurs présentaient une résistance, il démontra que celle-ci était due à la présence d'une enzyme qui transformait la

8-azaguanine en 8-azaxanthine. Puis, HIRSHBERG (43) montra que la réponse de la tumeur à l'action de la 8-azaguanine dépendait de la teneur en enzyme du tissu. MANDEL (75) (76) montra ensuite que l'administration de 8-azaguanine et de 4-amino-5-imidazolecarboxamide entraînait une augmentation de l'action carcinostatique de la 8-azaguanine, cette potentialisation étant due à l'inhibition de l'enzyme qui transforme la 8-azaguanine en une substance dont l'action est très faible, la 8-azaxanthine. Or, nous savons depuis les travaux de ROUSH et NORRIS (102) que cette enzyme est sans aucun doute la guanase. En 1968, CHOI (22) montra que d'autres inhibiteurs de la guanase comme la 6-mercaptopurine et la 5-fluorouracil avaient un effet carcinostatique. On voit donc l'intérêt que la connaissance de la teneur en guanase des divers tissus n'est pas à elle seule une condition suffisante. En effet, MANDEL (74) en 1954 et BENNET (10) ont montré qu'il y avait des différences d'utilisation de la guanine entre les tissus normaux et les tissus tumoraux et que des tissus qui incorporaient naturellement bien la guanine C^{14} dans les polynucléotides, ne l'incorporaient que très faiblement lorsqu'il s'agissait de tissus tumoraux. Puis, de LAMIRANDE (69) ayant montré que le taux de guanase hépatique, diminuait considérablement au cours de l'hépatome de Nanvikoff, MASCITELLI-CORIANDOLI (79) montra que la guanase diminuait fortement dans le carcinome 256 de Walker et LEVINE et HALL (70) montrèrent que toutes les tumeurs en général ne contenaient que de très faibles taux de guanase, alors que l'effet thérapeutique de la 8-azaguanine est exactement fonction du taux d'enzyme contenue dans la tumeur. En outre, HALL et LEVINE (36) établirent que l'administration de 8-azaguanine par voie orale était sans effet, probablement en raison de la grande quantité de guanase contenue dans l'intestin grêle, d'autre part, l'administration par voie intra-veineuse présente le double inconvénient de provoquer de nombreuses éruptions cutanées et d'être rapidement métabolisée au niveau du foie. On peut alors prolonger l'action grâce à une perfusion lente à travers l'artère nourricière de la tumeur, ce qui pourra entraîner sa régression si toutefois elle n'est pas trop riche en guanase.

Conclusions.

Ces observations peuvent-elles nous permettre de préciser le rôle physiologique de la guanase ? C'est, en tout cas, ce qu'a imaginé MURRAY (81).

Ayant remarqué que la guanine et la guanosine avaient un très faible effet toxique sur les cellules cancéreuses dérivées du cerveau, MURRAY (81) a, en effet, émis l'hypothèse que les purines désaminases joueraient au niveau des cellules normales, un rôle de protection vis-à-vis des effets toxiques de leurs substrats.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

CHAPITRE I : Technique de dosage de la guanine désaminase

CHAPITRE II : Influence de la congélation

CHAPITRE III : Activité guanine désaminasique chez « *Cavia Cobaya* »

CHAPITRE IV : Activité guanine désaminasique chez « *Vipera Aspis* »

CHAPITRE V : Activité guanine désaminasique du sang de diverses espèces animales.

CHAPITRE I

TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA GUANINE-DESAMINASE.

I - INTRODUCTION ET METHODOLOGIE - PRINCIPE.

Nous avons utilisé directement la méthode de HUE et FREE (49) et de KNIGHTS, WHITEHOUSE et SANTOS (61) pour les dosages effectués sur le sérum et sur les hématies. Pour les dosages effectués sur des organes, nous avons utilisé cette méthode en suivant les modifications indiquées par BASTIDE (6).

En tampon convenable, on fait agir à 37° C la préparation enzymatique sur la guanine. Au bout du temps fixé, on arrête l'action enzymatique par refroidissement en ajoutant rapidement du tampon phosphate à température du laboratoire. La variation de l'absorption optique de la solution est appréciée au spectrophotomètre à 245 m μ et permet de mesurer l'activité.

II - TECHNIQUE.

1 - Source d'enzyme :

Nous avons utilisé les principaux organes de « *Cavia Cobaya* » et de « *Vipera Aspis* ». En outre, étant donné l'intérêt particulier présenté par la connaissance des teneurs en guanase du sérum et des hématies, nous avons procédé à des recherches systématiques chez ces animaux d'une part et chez un certain nombre d'autres représentants du règne animal, d'autre part.

Pour obtenir les préparations enzymatiques d'organes de ces animaux, après les avoir tués selon une méthode déterminée pour chaque espèce, nous prélevons ces organes dans des tubes secs et tarés, maintenus à basse température. L'influence de la congélation n'étant pas nocive, nous avons toujours opéré sur des organes conservés à -20°C , décongelés et homogénéisés au fur et à mesure des besoins.

Pour les recherches effectuées sur le sérum et sur les hématies, nous prélevons le sang selon une technique propre pour chaque espèce animale, généralement sur héparine sèche, 1 mg d'héparine lyophilisée pour 10 ml de sang. Nous séparons ensuite le plasma et les hématies par centrifugation 5 minutes à 1 000 tours par minute. Les hématies sont lavées par remise en suspension dans du sérum physiologique, puis recueillies par une nouvelle centrifugation. Après trois lavages successifs, elles sont alors hémolysées par une agitation vigoureuse durant 10 minutes dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour constituer une solution mère au dixième. Nous préparons ensuite des dilutions convenables sur lesquelles les dosages sont effectués directement selon la technique de HUE et FREE (5).

Après décongélation, nous faisons une dilution convenable, par exemple au 1/10 en ajoutant 9 ml d'une solution isotonique de saccharose pour un gramme d'organe. Puis l'organe était broyé et la solution homogénéisée à l'aide d'un « Ultra-turax », en maintenant le tube contenant le mélange dans une solution réfrigérante. Le broyat terminé, une déprotéinisation chimique risquant d'entraîner des modifications d'absorption optique à $245\text{m}\mu$ nous procédions à une centrifugation à 18 000 g pendant 2 minutes à $+5^{\circ}\text{C}$ comme le conseille BASTIDE (6), (nous avons utilisé une centrifugeuse « International PR 2 »). Nous prélevons le surnageant et, à partir de ce dernier, réalisons nos différentes dilutions. De ces solutions, nous en retenons deux qui étaient celles pour lesquelles nous avons un pourcentage de substrat métabolisé moyen, la vitesse de la réaction étant alors sensiblement proportionnelle à la quantité de ferment mise en œuvre.

2) Réactifs :

a) Préparation du substrat :

Le substrat employé est la guanine sous forme de solution colloïdale.

Nous préparons tout d'abord une solution mère en faisant dissoudre 50,0 mg de guanine (soit 350μ moles) dans une fiole jaugée de 50 ml avec 10 ml de soude $\frac{N}{10}$ tout en chauffant légèrement. La solution était ensuite diluée à 50 ml avec de l'eau distillée et pouvait ainsi être conservée trois semaines en chambre froide. Au-delà de cette limite, nous avons observé la formation d'un précipité blanc et de grosses perturbations dans les résultats. Pour le dosage, nous avons employé une dilution au 1/20e préparée extemporanément avec du tampon borate 0,2 M à pH 7,5.

b) Préparation de la solution de xanthine :

Nous préparons tout d'abord une solution mère équivalente à la solution mère de guanine en faisant dissoudre 50 mg de xanthine dans une fiole jaugée de 50 ml avec 10 ml de soude $\frac{N}{10}$ tout en chauffant doucement. Puis cette solution était diluée à 50 ml avec de l'eau distillée. Comme pour la guanine, cette solution pouvait être conservée trois semaines en chambre froide et au moment du dosage, était diluée au 1/20e à l'aide de tampon borate 0,2 M à pH 7,5.

c) Préparation des solutions tampons :

— Tampon borate 0,2 M, pH 7,5 :

Nous avons dissous 2,5 grammes d'acide borique dans 200 ml d'eau distillée et ajusté le pH à 7,5 à l'aide d'une solution de soude à 40 % (V/V)

— Tampon phosphate 0,1 M à pH 6,0 :

Pour obtenir cette solution tampon, nous avons préparé d'abord deux solutions différentes :

Solution n° 1 :

- Phosphate de potassium monobasique cristallisé ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) : 9,078 g
- Eau distillée qsp : 1 000 ml.

Solution n° 2 :

- Phosphate de sodium bibasique anhydre (PO_4HNa_2) : 9,473 g.
- Eau distillée qsp : 1 000 ml.

Nous avons mélangé ensuite 120 ml de la solution n° 1 à 880 ml de la solution n° 2, ce qui nous amène à un pH final de 6,0.

3) Mode opératoire :

L'activité enzymatique est déterminée en mesurant la quantité de guanine transformée en xanthine. Pour mesurer cette activité guanasiqque, on prépare une solution de guanine standard et une solution de xanthine standard de concentrations équivalentes. La densité optique de la solution de xanthine correspond ainsi exactement à celle obtenue par la transformation totale de la guanine en xanthine.

On mélange dans un erlen-meyer de 25 ml, 4,0 ml de la solution diluée de guanine contenant 200 μ g de guanine tamponnée borate, 0,8 ml d'eau désionisée et 0,2 ml de la préparation enzymatique. Les flacons doivent tous être bien bouchés pour éviter l'évaporation et sont placés à 37° C dans un bain-marie à agitation, généralement pendant 30 minutes et 60 minutes. Ensuite, la réaction doit être arrêtée en refroidissant les erlen sous un courant d'eau froide pendant 20 secondes et en ajoutant ensuite 15 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 6,0 à la température ambiante. On mesurait ensuite la densité optique à 245 m μ au spectrophotomètre Zeiss PMQ II dans des cuves de quartz de 1 ml.

Puisque la moindre diminution de la densité optique est due à la conversion de la guanine en xanthine, il est nécessaire de mesurer la densité optique d'une solution pure avec 200 μ g de guanine et traitée de façon identique, la préparation étant remplacée par un égal volume d'eau. On a ainsi le zéro d'activité guanasiqque. De même, nous mesurons une solution pure de 200 μ g de xanthine dans les mêmes conditions, ce qui nous donnait le 100 % d'activité. L'absorption des solutions pures de guanine et de xanthine est mesurée par comparaison avec un réactif à blanc contenant 4,0 ml de tampon borate 0,2 M et 0,1 ml d'eau distillée, que l'on traite de la même manière que la solution réagissante.

III — EXPRESSION DES RESULTATS.

Les résultats sont exprimés d'une part en pourcentage de substrat métabolisé pendant la durée d'incubation et, d'autre part, en Unités Internationales.

Sur les différents tableaux exprimant les résultats en pourcentages, sont portées les moyennes arithmétiques des essais effectués pour chaque dilution et les écarts standards σ calculés d'après la formule suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\epsilon d^2}{n - 1}}$$

d = différence entre le résultat de chaque essai et la moyenne arithmétique des résultats pour chaque expérience,

n = nombre d'expériences.

L'unité retenue correspond à la quantité qui catalyse la transformation de 1 μ mole de guanine par minute à 37° C et à pH 7,5 ; nous l'exprimons en milli-unités par ml pour les liquides ou par gramme de tissus frais.

Puisque la quantité initiale de guanine dans la solution réagissante est de 200 μ g équivalent à 1,32 μ mole, l'activité guanasique en μ mole de guanine transformée par minute peut être évaluée par la formule suivante :

$$1,32 \times \frac{\text{Do de G} - \text{Do de R}}{\text{Do de G} - \text{Do de X}} \times \frac{n}{t} \times 1\,000$$

Do de G = densité optique de la solution de guanine pure,

Do de X = densité optique de la solution de xanthine pure,

Do de R = densité optique de la solution réagissante,

n = rapport de dilution $n = 5$ pour le sérum pur, ce qui donne un résultat par ml.

exemples : $n = 50$ pour une dilution au 1/10, on peut ainsi avoir le résultat en milli U/G.

t = temps d'incubation en minute.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA CONGELATION.

Nous avons étudié personnellement l'influence de la congélation à -25°C , vis-à-vis de l'activité guanine désaminasique, d'une part, sur un homogénat de foie de cobaye et, d'autre part, sur l'organe total. Afin d'éviter les risques de modifications dues à des congélations et des réchauffements successifs, l'organe avait été, dès le début, partagé en plusieurs morceaux répartis dans différents tubes et qui étaient homogénéisés au fur et à mesure des expériences selon la technique déjà exposée. Pour l'homogénat, nous avons procédé de façon comparable en préparant une dilution au 1/20 que nous avons répartie dans différents tubes pour la conservation.

En outre, nous avons fait subir à un même homogénat des congélations et des décongélations successives afin d'éprouver aussi complètement que possible la stabilité de ce ferment.

Nous avons condensé nos résultats dans les tableaux n^o 5, 6 et 7. Ainsi que nous nous en rendons compte à la lecture de ces tableaux, nous ne constatons aucune modification dans l'activité de cette enzyme ni en fonction du temps, ni en fonction de congélations répétées.

On en déduit qu'en dehors des précautions habituelles qui doivent toujours être observées lorsque l'on travaille sur du matériel vivant, aucune condition spéciale ne mérite d'être retenue en ce qui concerne la guanase qui se révèle être un ferment d'une extrême stabilité.

INFLUENCE DE LA CONGELATION SUR L'ACTIVITE
GUANINE DESAMINASIQUE DU FOIE DE *CAVIA COBAYA*

TABLEAU N° 5

1 - Organe frais		
Dilution	1/20	1/50
30 minutes	28 %	10 %
60 minutes	53 %	22 %
2 - Organe conservé — 1 mois		
Dilution	1/20	1/50
30 minutes	26 %	9,5 %
60 minutes	52 %	19 %
3 - Organe conservé — 2 mois		
Dilution	1/20	1/50
30 minutes	26,5 %	10 %
60 minutes	55 %	23 %

INFLUENCE DE LA CONGELATION SUR L'ACTIVITE GUANINE
DESAMINASIQUE D'UN HOMOGENAT AU 1/20 DE FOIE DE
CAVIA COBAYA.

TABLEAU N° 6

1 - Homogénat frais		
Dilution	1/20	1/50
30 minutes	27 %	10 %
60 minutes	53 %	18,5 %
2 - Homogénat conservé — 1 mois		
Dilution	1/20	1/50
30 minutes	28 %	10 %
60 minutes	53 %	22 %
3 - Homogénat conservé — 2 mois		
Dilution	1/20	1/50
30 minutes	26 %	9,5 %
60 minutes	50 %	21,5 %

INFLUENCE DE CONGELATIONS ET DE DECONGELATIONS SUCCESSIVES SUR L'ACTIVITE GUANINE DESAMINASIQUE D'UN HOMOGENAT AU 1/20 DE FOIE DE *CAVIA COBAYA*.

TABLEAU N° 7

Temps	30 minutes	60 minutes
Frais	24,5 %	50 %
12 jours	25 %	50 %
13 jours	25,5 %	53 %
14 jours	24 %	47 %
2 mois	26 %	51 %

C H A P I T R E I I I

ACTIVITE GUANINE DESAMINASIQUE CHEZ CAVIA COBAYA

I - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES :

Nous avons utilisé des cobayes de sexe mâle et de sexe femelle, d'un poids moyen de 250 grammes. Les cobayes étaient sacrifiés au moyen d'un tampon de chloroforme. Les organes, après dissection, étaient immédiatement portés au congélateur pour être retirés ensuite suivant les besoins. Comme il en sera pour *Vipera Aspis*, les organes étaient broyés et homogénéisés dans une solution de saccharose isotonique selon la technique précédemment exposée, après avoir été décongelés par un séjour de quelques heures en chambre froide.

Le sang était prélevé au moyen d'une seringue héparinée, en ponction intracardiaque et recueilli sur héparine sèche : 1 mg d'héparine lyophilisée pour 10 ml de sang. Nous avons immédiatement séparé plasma et hématies par centrifugation de 5 minutes à 1 000 tours/minute. Puis les hématies sont lavées quatre fois avec du sérum physiologique et hémolysées avec de l'eau distillée et une agitation vigoureuse pendant 10 minutes. Les dosages étaient effectués immédiatement ou après quelques heures en chambre froide si cela était nécessaire.

Nous avons exprimé nos résultats dans la série de tableaux suivants, en indiquant pour chaque organe la moyenne arithmétique des activités trouvées pour chaque expérience, en Unité Internationale par milligramme de tissu frais et à la ligne suivante les σ .

ACTIVITES GUANINE DESAMINASQUES DES PREPARATIONS
D'ORGANE DE *CAVIA COBAYA*.

TABLEAU N° 8

1 - Foie chez le mâle.

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		42	86	18,5	38
2		35	72	16	31
3		37,5	72	18,7	36,5
4		36	77,5	16,5	32
5		33	68,5	14	31
6		34,5	78	13,5	33
7		37	74	12	35,5
8		41	81	19,5	39
9		38	71,5	18	37,5
10		35,5	70,5	17,5	34
Moyenne		36,9	71,5	16,4	34,7
σ		2,8	5,4	2,5	2,9

L'activité guanasique du foie chez le mâle correspond à 1 672 U.I.

TABLEAU N° 9

2 - Foie chez la femelle :

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		24,5	49,5	9,5	26
2		26	52	10,5	23
3		28	53	13	24,5
4		30	59,5	15,5	32
5		23,5	50	11	25
Moyenne		26,5	52,8	11,9	26,1
σ		2,6	4	2,4	3,1

L'activité guanasique du foie chez la femelle correspond à 1 166 U.I.

TABLEAU N° 10

3 - Cerveau chez le mâle.

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		23	47	10,5	18
2		21,5	45,5	11	22,5
3		19	41	6,5	15,5
4		25	48	10,5	19
5		29	56,5	16	24
6		24,5	47,5	13	23,5
7		32	53	15	26
8		23	48,5	11,5	20,5
9		22	46	8,5	19,5
10		25,5	46,5	12	21
Moyenne		24,4	47,9	11,4	20,8
σ		3,7	4,2	2,8	3,1

L'activité guanasique du cerveau chez le mâle correspond à 1 056 U.I.

TABLEAU N° 11

4 - Cerveau chez la femelle :

Nbre d'animaux \ Dilution temps	1 / 20		1 / 50	
	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1	21	43,5	11,5	22
2	30	52,5	15,5	27,5
3	20	43	7,5	16
4	25,5	49	12	22,5
5	22	46	10	20
Moyenne	23,7	46,2	11,3	21,6
σ	4,4	4,1	2,9	4,2

L'activité guanasique du cerveau chez la femelle correspond à 1 043 U.I.

TABLEAU N° 12

5 - Reins chez le mâle :

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 10		1 / 20	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		16	32	8	17,5
2		22	40	13	21,5
3		21	43	9	19
4		17	35	11,5	19
5		13,5	31,5	8	15,5
6		16	32,5	7,5	15
7		20	38	9	21
8		16,5	33,5	10	16
9		18	34,5	8,5	18,5
10		15	31	5	13,5
Moyenne		17,5	35,1	8,9	17,6
σ		2,2	4	2,2	2,6

L'activité guanasiqne des reins chez le mâle correspond à 396 U.I.

TABLEAU N° 13

6 - Reins chez la femelle :

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 10		1/ 20	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		14	29,5	6,5	13
2		11,5	22	2,5	11,5
3		12,5	25	6	16
4		17	30,5	8	10
5		13	23,5	9,5	12
Moyenne		13,6	26	6,5	12,5
σ		2,1	3,7	2,6	2,2

L'activité guanastique des reins chez la femelle correspond à 286 U.I.

TABLEAU N° 14

7 - Intestin chez le mâle.

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 10		1 / 20	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		42	80	21	39
2		35	74,5	17	38
3		41,5	81	21,5	42
4		38,5	79,5	17	39
5		37	76,5	19,5	37,5
6		33	70	17,5	32,5
7		38	75,5	18	35
8		40	79,5	20	39,5
9		36,5	75	18,5	38
10		39	80	19	40
Moyenne		38,0	77,1	18,9	38,0
σ		2,2	3,5	1,6	2,6

L'activité guanasique de l'intestin chez le mâle correspond à 856 U.I.

TABLEAU N° 15

8 - Intestin chez la femelle.

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 10		1 / 20	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		43	85,5	18	40
2		41,5	85	22,5	42
3		36,5	78,5	20,5	39,5
4		40,5	82,5	19	41,5
5		38	80,5	16,5	36,5
Moyenne		39,9	82,5	19,3	39,9
σ		2,6	2,9	2,3	2,1

L'activité guanasique de l'intestin chez la femelle correspond à 913 U.I.

TABLEAU N° 16

10 - Testicules.

Nbre d'animaux \	Dilution	1/10		1/20	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		9	17,5	6	8
2		10	19	5	11
3		9	18	3,5	8,5
4		9,5	17,5	4,5	9
5		8	16	5	8,5
6		7,5	16	3	7
Moyenne		8,8	17,3	4,5	8,7
σ		0,9	1,2	1,1	1,3

L'activité guanine désaminasique des testicules correspond à 187 U.I.

TABLEAU N° 17

11 - Sérum chez le mâle :

Nbre d'animaux	Temps	
	30 minutes	60 minutes
1	17,5	35
2	20,5	38,5
3	18	35,5
4	16,5	33,5
5	17	36
Moyenne	17,9	35,7
σ	1,5	1,8

L'activité guanasique moyenne du sérum chez le mâle correspond à 39,2 U.I.

TABLEAU N° 18

12 - Sérum chez la femelle :

Nbre d'animaux	Temps	30 minutes	60 minutes
1		20,5	38
2		18,5	36,5
3		19	38,5
4		17	35,5
5		17,5	33
Moyenne		18,5	36,3
σ		1,4	2,2

L'activité guanine désaminasique moyenne du sérum chez la femelle correspond à 39,8 U.I.

II - RESULTATS.

Pour avoir une vue comparative de l'activité des différentes préparations étudiées, nous avons transposé nos résultats exprimés en milli-unités, dans le tableau n° 19 et nos résultats en pourcentage de substrat métabolisé, ramenés à une dilution au 1/20e après 60 minutes d'incubation, dans les figures n° 5 et 6.

TABLEAU N° 19

RESULTATS EN MILLI-UNITES INTERNATIONALES.

Animaux de sexe mâle	Organes	Animaux de sexe femelle
1 . 672	Foie	1 . 166
1 . 056	Cerveau	1 . 034
396	Reins	286
856	Duodénum	913
187	Testicules	
0	Cervelet	0
0	Pancréas	0
0	Coeur	0
0	Muscle de la cuisse	0
39,2	Plasma	39,8

FIGURE N° 5

Activités en pourcentages de substrat métabolisé
en 60 minutes pour une dilution au 1/20ème

COBAYES MALES

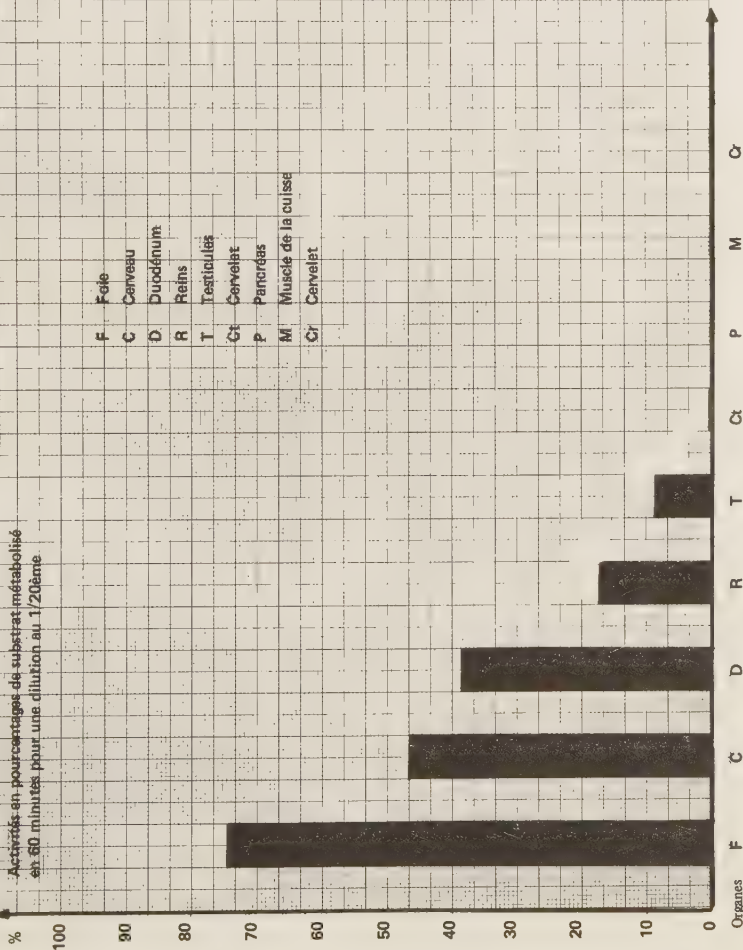


FIGURE N° 5

CORAYES FEMELLES

Achivées en pourcentages de substrat métabolisé
en 60 minutes pour une dilution au 1/20 ème.

%

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

F Foie
C Cerveau
D Duodénum
R Reins
Gt Gervelet
P Pancréas
M Muscles de la Cuisse
Cr Cœur
E Estomac

Organes

F

C

D

R

Gt

P

M

Cr

E

La lecture de ce tableau montre que les principaux organes ont une activité légèrement plus élevée ou au moins égale chez le mâle, à l'exception de l'intestin qui semble présenter une activité légèrement plus forte chez la femelle.

D'après ces figures, nous constatons que le cervelet, le pancréas, le muscle de la cuisse et le coeur n'ont absolument aucune activité. D'autre part, dans un ordre décroissant d'activité, nous avons : le foie, le cerveau, le duodénum et les testicules.

Quant au sang, les hématies ne présentent aucune activité dans une dilution au 1/10e. Le plasma, par contre, a une activité notable bien que faible, d'environ 39,2 milli-unités chez le mâle et 39,8 milli-unités chez la femelle. Il ne semble donc pas y avoir de différence entre le mâle et la femelle au niveau du plasma.

CHAPITRE IV

ACTIVITE GUANINE DESAMINASIQUE

CHEZ VIPERA ASPIS

I - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES.

Nous avons utilisé des vipères des deux sexes. Les animaux maintenus en état d'hibernation en chambre froide, étaient sacrifiés par section de la tête. Le sang qui s'écoulait alors était recueilli immédiatement sans anticoagulant, car, comme DASTUGUE le rappelle dans son mémoire de 1941 (25), nous savons que le sang de cet animal est très difficilement coagulable s'il est recueilli directement dans le vaisseau et à l'abri de tout facteur tissulaire, faute probablement de thromboplastine intrinsèque. C'est la raison pour laquelle, sans pousser la précaution jusqu'à effectuer la prise de sang par ponction intra-cardiaque, il est indispensable de n'exercer, pendant l'écoulement du sang, aucune pression sur le corps de l'animal, ce qui entraînerait inmanquablement une coagulation par apport de « suc » tissulaire. Comme chez le cobaye, les organes étaient immédiatement prélevés et portés au congélateur à -25°C . Au moment des expériences, ces organes étaient broyés et homogénéisés dans une solution de saccharose 0,25 M puis traités selon la technique déjà vue.

Quant au sang, une fois recueilli, il était immédiatement centrifugé à 100 tours par minute pendant 5 minutes afin de séparer les hématies du plasma puis des hémolysats étaient réalisés selon la technique déjà exposée plus haut.

Nous avons condensé nos résultats exprimés en pourcentage de substrat métabolisé dans la série de tableaux suivants et en précisant pour chaque organe la moyenne arithmétique des activités trouvées en milli-unité et le sigma.

Etant donnée l'extrême petite taille du cerveau de la vipère et la grande difficulté que nous avons de sélectionner un nombre suffisant d'animaux des deux sexes pour chaque expérience, après nous être assuré que les activités semblaient être identiques dans les deux cas par deux séries d'expériences sur des « pool » de trois cerveaux mâles et trois cerveaux femelles, nous avons été obligés d'effectuer la suite de nos expériences sur des « pool » de cerveaux mâles et femelles mélangés.

Signalons enfin qu'après centrifugation des organes, nous avons souvent observé la formation dans la partie surnageante d'une couche lipidique plus ou moins importante qu'il faut prendre garde de ne pas remettre en suspension. Pour ce faire, nous prélevions le liquide à l'aide d'une pipette fine que nous introduisions franchement au travers de la pellicule.

ACTIVITES GUANINE DESAMINASQUES DES PREPARATIONS
D'ORGANE DE *VIPERA ASPIS*.

TABLEAU N° 20

1 - Foie chez le mâle.

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 100		1 / 200	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		25,5	50	14,5	26
2		19	38	8	19,5
3		22	40	9,5	20
4		27	49	13,5	24
5		26	50	12,5	24
6		22	40	8,5	21
7		18	39,5	6	17,5
8		26	47	13	25
9		16	34,5	6	15,5
Moyenne		22,3	43,1	10,1	23,1
σ		4,0	5,8	3,2	3,6

L'activité guanine désaminasique du foie chez le mâle correspond à 4 620 U.I.

TABLEAU N° 21

2 - Foie chez la femelle :

Nbre d'animaux \ Dilution	temps	1/100		1/200	
		30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		8	16,5	5	7,5
2		3,5	12,5	0	5
3		6	15,5	2,5	7
4		6,5	16	5	8
5		16,5	25	9	16,5
6		13,5	23	6	11
Moyenne		8,6	18,0	4,5	9,1
σ		4,9	4,8	3,3	4,0

L'activité guanine désaminasique du foie chez la femelle correspond à

1870 U.I.

TABLEAU N° 22

3 - Cerveaux de vipères mâles :

Nbre d'animaux \	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		18,5	36,5	9	18
2		16	33	6,5	15
Moyenne		17,2	34,7	7,7	16,5
σ		1,7	2,5	1,7	2,1

L'activité guanine désaminasique du cerveau de vipère mâle correspond à 733,3 U.I.

4 - Cerveaux de vipères femelles :

Nbre l'animaux \	Dilutions	1 / 20		1 / 50	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		19	38,5	7,5	19
2		16,5	34	5	15,5
Moyenne		17,7	36,2	6,2	17,2
σ		1,7	3,1	1,7	2,4

L'activité guanine désaminasique du cerveau de vipère femelle correspond à 783,9 U.I.

TABLEAU N° 23

5 - Cerveau.

Nbre d'animaux \	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		15,5	31	6,5	13,5
2		22	40	8,5	19
3		17,5	34	9	18
4		17	37	8	15
5		20	41	11	20
Moyenne		18,4	36,6	8,6	17,1
σ		2,5	4,1	1,6	2,7

Pour cet organe, nous avons dosé sur un « pool » de cerveaux de mâles et de femelles.

L'activité guanine désaminasique du cerveau correspond à 814 U.I.

TABLEAU N° 24.

6 - Intestin grêle chez le mâle :

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		9	26	2,5	12
2		13,5	27,5	4,5	21
3		15	31	8	16
4		14	30	6,5	13,5
5		21,5	44	14	24,5
6		23	43	13	22,5
7		15	29	6	14
8		22	41	9	16
Moyenne		16,6	33,9	7,9	17,4
σ		4,9	7,4	3,9	4,4

L'activité guanine désaminasique de l'intestin chez le mâle correspond à 726 U.I.

TABLEAU N° 25

7 - Intestin grêle chez la femelle :

Nbre d'animaux \	Dilution	1 / 20		1 / 50	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		26	55	10,5	27
2		27	52	15	25,5
3		21	44,5	6,5	22
4		24	50	10,5	22,5
5		36	69	18	35,5
6		29,5	58	16	28
Moyenne		27,2	54,7	12,9	26,7
σ		5,1	8,3	4,3	4,9

L'activité guanine désaminasique de l'intestin de la femelle correspond à 1 188 U.I.

TABLEAU N° 26

8 - Reins de vipère mâle :

Nbre d'animaux \	Dilution	1 / 10		1 / 20	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		17	31	10	17
2		6	18,5	3	6
3		9	22	0,5	10
4		18	36	13,5	20,5
5		15	29	9	15,5
Moyenne		13	27,3	7,2	13,8
σ		5,2	7,0	5,5	5,4

L'activité guanine désaminasique des reins chez le mâle correspond à 286 U.I.

TABLEAU N° 27 *

9 - Reins chez la femelle :

Nbre d'animaux \	Dilution	1 / 10		1 / 20	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		25,5	50	13	25
2		24	47,5	10	24,5
3		34	62,5	19	34
4		29	42	6,5	19
5		19,5	40	8,5	20,5
6		29,5	58	15,5	28
Moyenne		25,4	50	12,1	25,1
σ		5,5	8,9	4,6	6,1

L'activité guanine désaminasique des reins chez la femelle correspond à 555 U.I.

II - RESULTATS :

Afin d'avoir une vue comparative de l'activité des différentes préparations étudiées, nous avons transposé nos résultats exprimés en milli-unités dans le tableau n° 28, et tout comme pour le cobaye, nos résultats exprimés en pourcentages de substrat métabolisé dans les figures n° 7 et 8 (ces résultats sont donnée pour une dilution de 1/20e après 60 minutes d'incubation).

TABLEAU N° 28

Animaux de sexe mâle	ORGANES	Animaux de sexe femelle
4 620	Foie	1 870
733,3	Cerveau	783,9
726	Reins	1 188
286	Intestin	550
0	Muscle dorsal	0
0	Coeur	0
0	Pancréas	0
0	Estomac	0

La lecture de ce tableau montre que le foie seul présente une activité réellement plus élevée chez le mâle, alors que les reins et l'intestin semblent avoir une activité plus élevée chez la femelle.

Voir figures n° 7 et n° 8 aux pages suivantes.

FIGURE N° 8

Activités en pourcentages de substrat métabolisé
en 60 minutes pour une dilution au 1/25^eème.

VIPÈRES FÉMINES

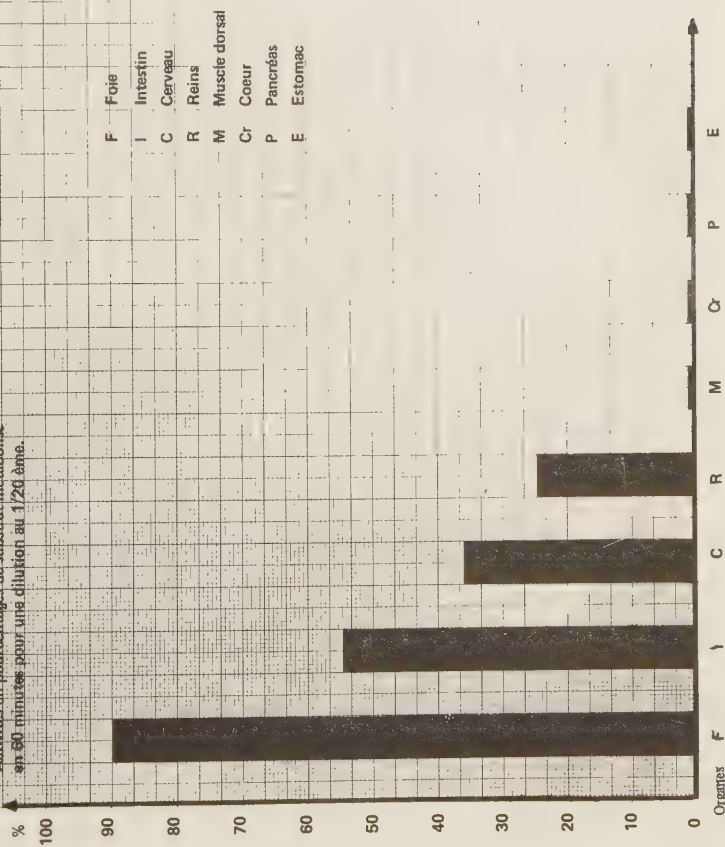
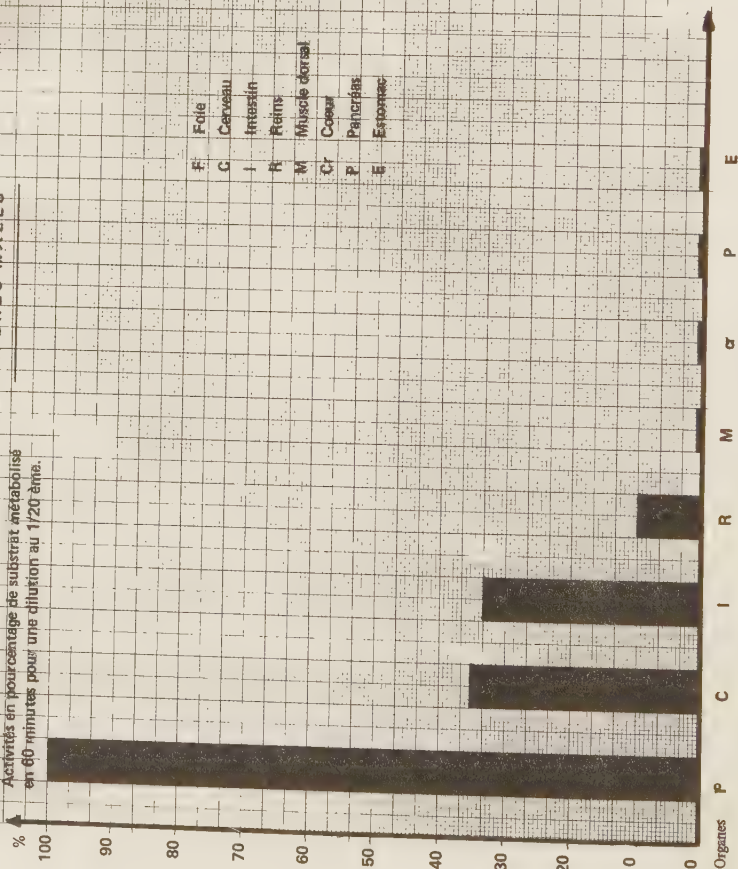


FIGURE N° 7

Activités en pourcentage de substrat métabolisé
en 60 minutes pour une dilution au 1/20 ème.

VIPERES MALES



D'après ces figures, nous constatons que nous retrouvons dans un ordre décroissant : le foie, le cerveau, l'intestin et les reins chez le mâle et le foie, l'intestin, le cerveau et les reins chez la femelle.

Nous remarquons, en outre, la très grande différence qui existe entre le foie chez le mâle et chez la femelle, l'activité étant pour cet organe plus du double chez le mâle de celle trouvée pour la femelle. En outre, il est très intéressant de noter que le phénomène invers se produit au niveau du duodénum.

Quant au sang, nous n'avons décelé aucune activité, tant au niveau du sérum qu'à celui des hématies chez les animaux de l'un et l'autre sexe.

CHAPITRE V

ACTIVITÉ GUANINE DÉSAMINASIQUE DU SANG DE DIVERSES ESPECES ANIMALES

Outre les activités enzymatiques du sérum et du plasma de « *Cavia Cobaya* » et de « *Vipera Aspis* », que nous venons d'étudier, il nous a paru intéressant de connaître les activités du sang d'un certain nombre d'animaux domestiques.

I - OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES.

Nous avons cherché à apprécier l'activité guanine désaminasique dans le sang de boeuf, porc et mouton d'une part et dans le sang de poule, pintade, dinde, canard et oie d'autre part.

Le sang était prélevé au moment du sacrifice de l'animal par section de l'artère carotide et recueilli dans des flacons contenant 1 mg d'héparine lyophilisée pour 10 ml de sang. Afin d'éviter la présence de suc tissulaire dû à la contusion des tissus au moment du sacrifice, nous laissions toujours s'écouler un peu de sang avant d'effectuer le prélèvement que nous interrompions toujours avant l'exsanguination totale de l'animal. Nous remercions ici la direction et le personnel des Abattoirs Municipaux et les marchands de volaille qui ont bien voulu nous apporter leur concours.

Le sang était ensuite traité selon la technique que nous avons déjà exposée. Séparation des hématies et du plasma par centrifugation à 100 tours par minute, puis lavage des hématies au sérum physiologique et enfin hémolyse totale dans de l'eau distillée.

II - RESULTATS.

Dans nos conditions d'expérience, nous n'avons relevé aucune activité tant au niveau du plasma qu'à celui des hématies, chez les mammifères, le boeuf, le porc et le mouton.

En ce qui concerne les oiseaux, nous n'avons relevé aucune activité dans les hématies et le sérum de la poule, la dinde et la pintade. Au contraire, si les sérums d'oies et de canards ne présentent pratiquement aucune activité, nous avons décelé la présence de guanase dans les hématies de ces espèces en quantité non négligeable. Nous avons condensé l'ensemble de nos résultats pour ces deux animaux dans les tableaux n° 29 et 30 en pourcentage de substrat métabolisé ; ces résultats transcrits en milli-unités, selon la définition que nous en avons donnée précédemment, correspondent à 880 U.I. pour les hématies d'oie et à 308 U.I. pour les hématies de canard.

TABLEAU N° 29

I - Hématies d'oie :

Nbre d'animaux	Dilution	1 / 20		1 / 40	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		29	59	13	31,5
2		26,5	44,5	8,5	26
3		37,7	68	17,5	37,5
4		28	57	14	26,5
5		31,2	59	16,1	30,5
6		27	50	11	26,5
7		37,5	63,5	18,5	37
8		33,2	64	18	33
9		31,5	58	19,5	32
10		29	56	14	26,5
11		31,5	64	16,5	32
Moyenne		31,1	60,0	15,1	30,8
σ		3,3	6,9	4,3	4,2

L'activité guanine désaminasique des hématies d'oie correspond à 880 U.I.

TABLEAU N° 30

2 - Hématies de canard :

Nbre d'animaux	Dilutions	1 / 10		1 / 20	
	Temps	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
1		14	31,5	8,5	15
2		14,5	32,5	9,7	16
3		16	28,5	0,7	15,5
4		8,7	21	4	10
5		16,5	28	11	18
6		23,5	34	12	22
7		12	18,5	9	12,7
8		9,7	25,5	6,7	11
9		13,5	25,7	6	10,5
10		12	26	4,5	9,7
Moyenne		14,0	27,1	7,2	14,0
σ		4,1	4,8	3,4	4,0

L'activité guanine désaminasique des hématies de canard correspond à 308 U.I.

TABLEAU N° 31

3 - Activité guanine désaminasique du sang de diverses espèces animales :

Espèces animales	Sérum	Hématies
Vipère	0	0
Cobaye	39,7	0
Boeuf	0	0
Mouton	0	0
Porc	0	0
Dinde	0	0
Poule	0	0
Pintade	0	0
Canard	0	308
Oie	0	880

Ces résultats, pour surprenants qu'ils soient, sont à rapprocher de ceux trouvés par LEVINE (70) que nous avons mentionnés dans la partie bibliographique au tableau n° 1.

C H A P I T R E V I

ESQUISSE D'INTERPRETATION

Pour ce qui est de nos résultats :

L'examen de nos tableaux n'est pas sans soulever quelques difficultés en ce qui concerne les résultats qu'ils apportent et qui, en première lecture, pourraient presque paraître aberrants.

Sans prétendre donner une solution complètement satisfaisante dans tous les cas, nous voudrions insister sur les trois points suivants :

1 - En ce qui concerne les différences suivant les espèces animales, on sait et depuis très longtemps qu'elles peuvent être considérables, ainsi, se reportant à des moyennes qui étaient établies à l'époque en pourcentage d'hydrolyse, nous constatons que, pour l'aspirine estérase, en ce qui concerne le sérum d'un certain nombre d'espèces animales, dans les mêmes conditions où l'hydrolyse spontanée était de 5 après une heure d'incubation les valeurs rapportées par DASTUGUE et FAVIER (26) (27) s'établissent ainsi qu'il suit :

Homme = 15 ; Cobaye = 91 ; Lapin = 25 ; Rat = 20 ;
 Cheval = 11 ; Porc, Boeuf et Veau = 5 ; Oie = 42 ; Pigeon = 41 ;
 Poule = 14 ; Vipère = 46 ; Grenouille = 8 ; etc

De même, l'hydrolyse de la procaine par le sérum d'un certain nombre d'espèces animales suivant les résultats de René HAZARD et Colette BONAMY (40), s'établissaient en pourcentage d'hydrolyse après trente minutes d'incubation de la façon suivante.

Homme = 100 ; Magot = 60 ; Cobaye = 9 ; Lapin = 31 ; Rat = 1 ;
 Cheval = 27 ; Porc = 7 ; Boeuf = 3 ; Renard = 9 ; Chien = 3 ;
 Pigeon = 57 ; Anguille = 28 ; Carpe = 11.

Dans tous ces cas et dans bien d'autres, comment établir *a priori* une relation simple entre la nature de l'espèce animale envisagée et le pouvoir enzymatique de son sérum ?

2 - En ce qui concerne les différences enzymatiques suivant le sexe, là, également, nous n'avons pas procédé à des recherches systématiques qui se seraient trouvées en dehors de notre sujet. Prenant simplement au hasard des documents qui se trouvaient à ce moment à notre portée, nous constatons que si cette différence est parfois faible, nous dirions aujourd'hui non absolument significative (en ce qui concerne l'aspirine-estérase de tout à l'heure, et dans les conditions déjà précitées : Canard = 18 ; Cane = 23 et pour la procaine estérase : Cane = 96 ; Canard = 85 ; Coq = 10 ; Poule = 25), il est d'autres cas où, au contraire, la différence est très nette et nous allons en donner également quelques exemples. Ainsi, une communication inédite de M. Pierre JOUANEL qui doit paraître dans sa thèse de doctorat en Pharmacie en cours de préparation mais dont il nous a autorisé à faire état dans ce chapitre nous montre que, en ce qui concerne l'activité γ -glutamyl-transpeptidasique chez la Vipère, nous avons au niveau du rein et du pancréas les résultats suivants :

Au niveau du Rein :

- Activité exprimée en μ moles $\times 10^{-2}$ de β -Naphtylamine libérée par action enzymatique G.G.T.P. sur la γ -glutamyl- β -Naphtylamide.
- Source enzymatique : Homogénats de Reins de Vipères mâles et femelles préparés par dilution au 1/10e dans H_2O distillée.

Activité moyenne chez les mâles :

- 15' d'incubation : $4,75 \mu$ moles $\times 10^{-2}$ /0,1 ml d'homogénat
- 30' d'incubation : 8μ moles $\times 10^{-2}$ /0,1 ml d'homogénat
- 60' d'incubation : $13,75 \mu$ moles $\times 10^{-2}$ /0,1 ml d'homogénat

Activité moyenne chez les femelles :

- 15' d'incubation : $10,40 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$
- 30' d'incubation : $15,46 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$
- 60' d'incubation : $22,50 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$

Au niveau du pancréas :

Homogénats au 1/10e de Pancréas de Vipères mâles et femelles dans H_2O distillée.

Quantité d'homogénat utilisé : 0,1 ml.

Activité moyenne chez les mâles :

- 15' d'incubation : $0,60 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$
- 30' d'incubation : $1,25 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$
- 60' d'incubation : $2,40 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$

Activité moyenne chez les femelles :

- 15' d'incubation : $1,2 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$
- 30' d'incubation : $2,05 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$
- 60' d'incubation : $3,75 \mu \text{ moles} \times 10^{-2} / 0,1 \text{ ml d'homogénat}$

3 - En ce qui concerne les variations du taux de la guanine désaminase elle-même, en fonction de l'espèce et des différents tissus, nous prions le lecteur de bien vouloir se reporter au tableau n° 1 qui figure dans la partie bibliographique de ce travail et dans lequel, d'après LEVINE, nous voyons également des différences quantitatives extrêmement marquées d'une espèce animale à l'autre que ce soit au niveau du sang et au niveau des tissus.

Les différences que nous avons constatées nous-mêmes ne font donc que s'ajouter à celles figurant déjà dans la littérature mais si elles sont donc on ne peut plus vraisemblables, une interprétation valable reste encore à trouver.

RESUME ET CONCLUSION GENERALE.

I - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE -

Nous constatons que, d'une façon générale, il semblerait que la guanine soit une enzyme tout à fait universellement répandue. Toutefois, il est bon de noter qu'à notre connaissance, il ne fut réalisé qu'un nombre limité de travaux sur les insectes et qu'aucune recherche n'a été effectuée dans le règne végétal.

Sur le plan pathologique, il faut noter l'importance que devrait prendre la recherche de cette enzyme dans le diagnostic de l'hépatite virale et le rôle qu'elle semblerait jouer dans l'évolution de certaines tumeurs malignes.

II - PARTIE EXPERIMENTALE -

1° - Du point de vue de la préparation des milieux enzymatiques :

Il est particulièrement intéressant de noter que les préparations enzymatiques semblent douées d'une stabilité extraordinaire à -20°C et qu'il soit possible non seulement de les conserver plusieurs mois à cette température sans risque apparent d'altération de l'activité, mais même de les soumettre à une série de congélations et de décongélations successives.

2° - Pour ce qui est de nos résultats proprement dits :

a) Nous constatons qu'au niveau d'un homéotherme comme le *Cobaye* mâle, nos résultats portant sur des séries de dix expériences dans le

sens des activités enzymatiques décroissantes, les organes peuvent se ranger dans l'ordre suivant :

- le foie au-dessus de 1 500 U.I., le cerveau au-dessus de 1 000 U.I., le duodénum au-dessus de 850 U.I., les reins au voisinage de 400 U.I., les testicules au voisinage de 180 U.I., enfin le cervelet, le pancréas, le coeur et le muscle strié qui ne présentent qu'une activité négligeable.

b) D'autre part, nous constatons qu'au niveau d'un poikilotherme comme la *Vipère* mâle, nos résultats portant sur une dizaine d'expériences, dans le sens des activités enzymatiques décroissantes, les organes peuvent se ranger dans l'ordre suivant :

- le foie au-dessus de 4 500 U.I., le cerveau au-dessus de 730 U.I., les reins au-dessus de 720 U.I., l'intestin au-dessus de 280 U.I., enfin les muscles striés, le coeur, le pancréas et l'estomac avec des activités pratiquement nulles.

c) En outre, pour ce qui concerne les différences dues au sexe, nous avons été amenés à constater qu'elles pouvaient être très importantes et la plupart du temps véritablement significatives. Ces différences pouvant d'ailleurs s'établir parfois au profit d'un sexe et parfois au profit de l'autre. C'est ainsi qu'au niveau du foie chez le *Cobaye*, nous avons en moyenne 1 672 U.I. pour le mâle contre 1 166 U.I. en moyenne chez la femelle et pratiquement égalité au niveau du cerveau. Tandis que chez la *Vipère*, si le foie l'emporte encore chez le mâle et même de façon tout à fait remarquable avec 4 620 U.I. en moyenne contre seulement 1 870 U.I. en moyenne, chez la femelle et si nous constatons encore une relative égalité au niveau du cerveau, il n'en va plus de même au niveau des reins et de l'intestin. En effet, chez la *Vipère*, il nous est apparu que les activités enzymatiques des reins et de l'intestin chez la femelle l'emportaient sur celles observées chez le mâle avec 1 158 U.I. en moyenne pour les reins et 550 U.I. en moyenne pour l'intestin chez la femelle contre en moyenne 726 U.I. et 286 U.I. pour ces mêmes organes chez le mâle.

d) Enfin, en ce qui concerne l'activité guanine désaminasique du sang de diverses espèces animales, nous devons constater que la plupart de nos résultats se sont révélés négatifs sauf en ce qui concerne le sérum de Cobaye, 39,7 U.I. , les hématies de canard avec 308 U.I. et les hématies d'oie avec

880 U.I. en moyenne. Il est donc assez étonnant de constater qu'un assez grand nombre d'espèces animales ne présentent qu'une activité négligeable tant au niveau des hématies que du plasma ou du sérum et qu'un petit nombre seulement présente une activité au niveau du sang, celle-ci se situant soit au niveau des hématies, soit au niveau du sérum ou du plasma.

Pour surprenant qu'ils soient, ces résultats se situent dans la même ligne que ceux présentés par LEVINE (70) et que nous avons mentionnés page 32 et nous en avons présenté une esquisse d'interprétation.

En définitive, la guanine désaminase nous apparaît comme une enzyme extrêmement intéressante mais dont l'étude prête encore à de grandes discussions aussi bien en ce qui concerne sa répartition suivant les espèces, les organes et le sexe et l'appoint éventuel que son dosage pourrait apporter en physiopathologie.

Vu, le Président de Thèse

Clermont-Ferrand le 11 juin 1970

G. DASTUGUE

Vu et Permis d'Imprimer le 12 Juin 1970

N° Ph 6/70

Le Doyen

G. MEYNIEL

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANDERSON (A.D.) and PATTON (R.L.) -
In vitro studies of uric acid synthesis in insects.
J. Exp. Zool. 1955, 128, 443-51.
- 2 - ASSOUS (E.), DREUX (C.) and GIRARD (M.) -
Application nouvelle à la détermination de l'ammoniémie.
Ann. Biol. Chim., 1960, 18, 319.
- 3 - BAKER (B.R.) -
Irreversible enzyme inhibitors. Inhibitors of guanine desaminase.
J. Med. Chem., 1967, 10, (1), 59-61.
- 4 - BARCLAY (R.K.) and GARFINKEL (E.) -
Glycine and adenine as precursors of nucleic purines in Tumor-Bearing mice.
J. Biol. Chem., 1955, 212, pp. 97.
- 5 - BARKER (H.A.) and BECK (J.V.) -
The fermentative decomposition of purines by *Clostridium Acidurici*, and *Clostridium Cylindrosporum*.
J. Biol. Chem., 1941, 141, pp. 3-27.
- 6 - BASTIDE (J.) et BASTIDE (P.) -
Activité guanine-désaminasique, rénale, hépatique et sanguine chez le Rat au cours de l'intoxication expérimentale au nitrate d'uranyle.
C.R. Soc. Biol., 1968, 162, (5-6), 1169-71.
- 7 - BECK (J.V.) -
The degradation of purines by *Clostridium acidurici*.
Bactériol. Proc., 1950, 1950, 38.
- 8 - BEL (A.), DIETZ (R.) et al. -
La Guanine désaminase ou Guanase, enzyme de cytolysse hépatique. Sa valeur diagnostique à propos de 500 malades.
Pres. Méd., 1970, 78, n° 11, 495-499.

- 9 - BENDALL (D.S.) and de DUVE (C.) -
Tissue fractionation studies.
Biochem. J., 1960, 74, 444-450.
- 10 - BENNETT (L.L.), SKIPPER (H.E.), STOCK (C.C.) and RHOADS (C.P.) -
Searches for exploitable biochemical differences between normal and cancer cells. Nucleic acid purine metabolism in animal neoplasm.
Cancer. Res., 1955, 15, 485.
- 11 - BERSAQUES (J. de) -
Purine and pyrimidine metabolism in human epidermis.
J. Invest. Dermat., 1967, 48, 169-173.
- 12 - BLOCK (W.D.), DORIS (V.) and JOHNSON (M.S.) -
Studies of the enzymes of purine metabolism in skin.
J. Invest. Dermat., 1954, 23, 471-78.
- 13 - BLOCK (W.D.) and JOHNSON (D.V.) -
Studies of the enzymes of purine metabolism in skin. Guanase activity in rat skin.
J. Biol. Chem., 1955, 217, 43.
- 14 - BOWKIEWICZ-SURMA (E.) and KRAWCZYNSKI (J.) -
Determination of guanase activity in serum and tissues of normal rats and of rats intoxicated with carbon tetrachloride.
Clin. Chim. Acta, 1967, 16 (1), 29-31.
- 15 - BRODY (S.) -
Acta. Obst. et Gynec. Scand., 1953, 32, suppl. 6, 23.
- 16 - BUDAN de RUSSE (J.) et WEILL (J.) -
Sur le dosage de la guanase sérique.
Rev. Méd. Tours, 1966, 7, 363-364.
- 17 - BUENGENER (W.) -
Adénosine deaminase and nucleoside phosphorylase in malarial parasites.
Z. Treponen. Med. Parasitol., 1967, 18, 48-52.
- 18 - CARAWAY (W.T.) -
Colorimetric determination of serum guanase activity.
Clin. Chem., 1966, 12, pp. 187-193.
- 19 - CARLO (P.E.) and MANDEL (H.G.) -
Cancer. Res., 1954, 14, 459.

- 20 - CARTER (C.E.) -
Paper chromatography of purine and pyrimidine derivatives of yeast ribonucleic acid.
J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1466-71.
- 21 - CHITRE (V.S.) and TALWAR (G.P.) -
Ind. J. Med. Res., 1963, 51, 80.
- 22 - CHOI CHANG-HEUNG -
Effect of antitumor agents on the guanine deaminase activity of Sarcoma 180 ascite cell in vitro.
Chungang Uihak, 1968, 15, 289-293.
- 23 - CONWAY (E.J.) -
Biochem. J., 1932, 27, 430.
- 24 - CURRIE (R.), BERGEL (F.) and BRAY (R.C.) -
Enzymes and Cancer. Preparation and some properties of guanase from rabbit liver.
Biochem. J., 1967, 104, 634-638.
- 25 - DASTUGUE (G.) -
Les Vipères vues par les physiologistes.
Bull. Hist. et Sc. Auvergne, 1941, 61, 36.
- 26 - DASTUGUE (G.) et FAVIER (R.) -
De l'hydrolyse enzymatique de quelques médicaments dans l'organisme.
Le Concours Med., 1952, 12, 6.
- 27 - DASTUGUE (G.) et FAVIER (R.) -
Sur la répartition de l'aspirine estérase et l'action de quelques effecteurs.
Thérapie, 1951, 6, n° 5, 397.
- 28 - DIXON (M.) and WEBB (E.) -
In Enzymes.
Second ed. Longman editors, 1962.
- 29 - FARINA (B.) and LEONE (E.) -
Phosphatases and nucleases in cephalopods.
Biochem. J., 1963, 89, 7 P.

- 30 - GEIGER (A.) -
Metabolism of the nervous system.
Pergamon Press London, 1957, pp. 245.
- 31 - GETLER (H.P.), ROLL (P.M.), TINKER (J.F.) and BROWN (G.B.) -
J. Biol. Chem., 1949, 178, 469.
- 32 - GIUSTI (G.) and GALANTI (B.) -
Attività guanasicca del siero umano nella epatite virale ed in altre epatopatie.
Boll. Soc. Ital., Biol. Sper., 1965, 41, 1567.
- 33 - GIUSTI (G.) and GALANTI (B.) -
Ricerche su alcune deaminasi del siero in corso di hepatitis virale, umane sperimentale.
Minerva Medica, 1965, 56, (101), 4448-4452.
- 34 - GIUSTI (G.) and GALANTI (B.) -
Serum deaminases during human and experimental viral hepatitis.
Epatologia, 1966, 12, 255-260.
- 35 - GREENSTEIN (J.P.), CARTER (C.E.), CHALKLEY (H.W.) and LEUTHARDT (F.M.) -
Metabolism of nucleic acids of tissues extracts.
J. Nat. Cancer. Inst., 1946, 7, 9-45.
- 36 - HALL (T.C.), LEVINE (R.), and HARRIS (C.A.) -
The effect of human catalytic enzymes upon the duration and distribution of antimetabolite action : Guanase-8-azaguanine system.
Biochem. Pharmacol., 1961, 8, 71.
- 37 - HARTLEY (W.N.) -
Absorption spectrale de l'acide urique, de la murexide et des ureides, en relation avec leur couleur et leur structure chimique.
J. Chem. Soc., 1905, 87, 1796.
- 38 - HAYASHI (T.T.) -
Studies on placenta metabolism.
Am. J. Obst. Gynec., 1963, 93 (2), 266-268.
- 39 - HAYASHI (T.T.), BALDRIDGE (R.C.), OLMSTED (P.S.) and KIMMEL (D.L.) -
Purine nucleotide catabolism in placenta.
Am. J. Obst. Gynec., 1964, 88, 470.

- 40 - HAZARD (R.) et BONAMY (C.) -
Hydrolyse de la procaine par le sang de quelques animaux.
C.R. Soc. Biol., 1948, 142, 743.
- 41 - HEALD (P.J.) -
Phosphates from cerebral tissue which increase in radioactivity in the presence of phosphorus-32 labeled during the passage of electrical pulses.
Biochem. J., 1957, 65, 3 P.
- 42 - HEYROTH (F.F.) and LOOFBOUROW (J.R.) -
Modifications du spectre d'absorption dans l'ultra-violet des uracils et des composés apparentés.
J. Am. Chem. Soc., 1931, 53, 3441-3453.
- 43 - HIRSHBERG (E.), KREAM (J.) and GELLHORN (A.) -
Enzymatic deamination of 8-azaguanine in normal and neoplastic tissues.
Cancer. Res., 1952, 12, 524.
- 44 - HITCHINGS (G.H.) -
The estimation of guanine and xanthine.
J. Biol. Chem., 1941, 139, 843-853.
- 45 - HITCHINGS (G.H.) and FALCO (E.A.) -
Guanine identification in *Girella Nigricans* extracts.
Proc. Nat. Acad. Sc. Wash., 1944, 30, 294-297.
- 46 - HITCHINGS (G.H.) and FISKE -
J. Biol. Chem., 1941, 140, 491-499.
- 47 - HOGEBOOM (G.H.) and SHNEIDER (W.C.) -
J. Biol. Chem., 1953, 204, pp. 233.
- 48 - HOLIDAY (E.R.) -
The characteristic absorption of U.V. radiations by certain purines.
Biochem. J., 1930, 24, 619.
- 49 - HUE (A.C.) and FREE (A.) -
An improved method for the determination of guanase in serum or plasma.
Clin. Chem., 1964, 10, 631-632.

- 50 - HUE (A.C.) and FREE (A.) -
An improved method for determination of guanase in serum or plasma:
Clin. Chem., 1965, 11, 708-715.
- 51 - HYDEN (H.) -
Acta Physiol. Scand., 1943, 6, suppl. 17.
- 52 - JOHNSON (D.V.) and BLOCK (W.D.) -
Guanin deaminase activity of rat in tegument.
Feder. Proc., 1954, 13, 237.
- 53 - JORDAN (W.K.), MARCH (R.), BOYDHOUCHIN (O.) and POPP (E.) -
Intracellular partition of purine in rodent brain.
J. Neurochem., 1959, 4, 170-174.
- 54 - JOSAN (V.) and KRISHNAN (P.S.) -
Regulation of rat liver guanin aminohydrolase by G.P.T.
Biochem. and Biophys. Res. Com., 1968, 31, 209-301.
- 55 - JOHNSON (D.V.) and BLOCK (W.D.) -
Guanine deaminase activity of rat in tegument.
Fed. Proc., 1954, 13, 237.
- 56 - KALCKAR (H.M.) -
Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes.
J. Biol. Chem., 1947, 167, 429-459.
- 57 - KALCKAR (H.M.) -
Studies of the enzymes of purine metabolism.
J. Biol. Chem., 1947, 167, 461-486.
- 58 - KEILIN and HARTREE -
Proc. Roy. Soc. London. Sper. B., 1937, 124, 397.
- 59 - KIDDER (G.W.), DEWEY (U.C.), PARKS (R.E.) and WOODSIDE (G.L.) -
Purine metabolism in tetrahymena and its relation to malignant cells in mice.
Science, 1949, 109, 511.
- 60 - KIELLY (W.W.) and KIELLY (R.K.) -
J. Biol. Chem., 1951, 191, 485.

- 61 - KNIGHTS (E.M.), WHITEHOUSE (J.L.), HUE (A.C.) and SANTOS (C.L.) -
Determination of serum guanase.
J. Lab. Clin. Méd., 1965, 65, 355-360.
- 62 - KONTTINEN (N.), LOUHIJA (A.) and HARTEL (G.) -
Serum guanine deaminase ornithine carbamoyltransferase and γ glutamyl transpeptidase activities in chronic alcoholics.
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 1968, 46, 18-22.
- 63 - KUMAR (S.), JOSAN (V.), SANGER (K.C.S.), TEWARI (K.K.) and KRISHNAN (P.S.) -
Studies on guanine deaminase and its inhibitors in rat tissues.
Biochem. J., 1967, 102, 691-704.
- 64 - KUMAR (S.) and SUDHIR -
Guanine deaminase in developing rat brain.
Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 692-694.
- 65 - KUMAR (S.), TEWARI (K.K.) and KRISHNAN (P.S.) -
Partial purification of guanine deaminase inhibitor from rat brain.
J. Neurochem., 1965, 12, 1003.
- 66 - KUMAR (S.), TEWARI (K.K.) and KRISHNAN (P.S.) -
Guanine deaminase activity in rat brain and liver.
Biochem. J., 1965, 95, 797-802.
- 67 - KUMAR (S.), TEWARI (K.K.) and KRISHNAN (P.S.) -
Solubilization and partial purification of guanine deaminase from rat brain.
J. Neurochem., 1966, 13, 1550.
- 68 - KYANK (H.) -
Xanthine oxidase determination in the human placenta.
Zentralb. Gynäk., 1955, 77, 1390.
- 69 - LAMIRANDE (G. de), ALLARD (C.) and CANTERO (A.) -
Purine metabolizing enzymes in normal rat liver, and Nandovikoff hepatoma.
Cancer. Res., 1958, 18, 952.
- 70 - LEVINE (R.), HALL (T.C.) and HARRIS (C.A.) -
Guanine activity in normal and neoplastic human tissues.
Cancer, 1963, 16, 269-272.

- 71 - LINDAHL (E.) and SVARD (P.O.) -
Guanine metabolism in fishes. The occurrence of guanine deaminating enzyme in fish skin.
Acta. Chem. Scand., 1957, 11, 846-853.
- 72 - LINEWEAVER (H.) and BURK (B.) -
J. Am. Chem. Soc., 1934, 56, 658.
- 73 - LISA (L.) and LUDWIG (D.) -
Uricase, guanase and xanthine oxidase from the fat body of Cockroach *Leucophea Maderae*.
Ann. Entomol., Soc., 1959, 52, 548.
- 74 - MANDEL (H.G.) and CARLO (P.E.) -
The incorporation of guanine into nucleic acids of tumor-bearing mice.
J. Biol. Chem., 1953, 201, 335.
- 75 - MANDEL (H.G.), LAW (L.W.) -
The effect of 4-Amino-5-imidazolecarboxamide on the carcinostatic action of 8-azaguanine.
Cancer..Res., 1954, 14, 808.
- 76 - MANDEL (H.G.), WAY (J.L.) and SMITH (P.K.) -
The effect of 4-Amino-5-imidazolecarboxamide on the incorporation of purine into liver nucleic acids of the mouse.
Biochim. Biophys. Acta., 1957, 23, 402-404.
- 77 - MANSOOR (M.), KALYANKAR (G.D.) and TALWAR (G.P.) -
Brain guanase : Purification, properties and regional distribution in Monkey brain.
Acta. Neurol. Scand., 1962, 38, suppl. 1, 48.
- 78 - MANSOOR (M.), KALYANKAR (G.D.) and TALWAR (G.P.) -
Brain guanine deaminase : purification, properties and regional distribution.
Biochim.. Biophys., Acta., 1963, 77, 307-317.
- 79 - MASCITELLI-CORIANDOLI (E.) and LANZANI (P.) -
Attività guanasica della milza di ratti portatori di tumor.
Atti. Acad. Med. Lombarda., 1964, 19, 80-81.
- 80 - Mc LEOD (S.) -
Evaluation of serum guanase as a liver function test.
Canad. J. Med. Technol., 1967, 29 (2), 60-68.

- 81 - MURRAY (M.R.), PETTERSON (E.R.), HIRSCHBERG (E.) and POOL (J.L.) -
Metabolic and chemotherapeutic investigation of human glioblastoma in vitro.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1954, 58, 1147-1171.
- 82 - MUSSER (A.W.), ORTIGOZA (C.), VASQUEZ (M.) and RIDDICK (J.) -
Correlation of serum enzymes and morphologic alterations of the liver.
Am. J. Clin., Path., 1966, 46, 82.
- 83 - NECKEL (A.) -
Mikroskopie., 1954, 9, 113.
- 84 - NEUBERG (C.), STRAUSS (E.) and LEPKIN (L.E.) -
Convenient method for deproteinization.
Arch. Biochem., 1944, 4, 101-104.
- 85 - NEUHOFF-VOLKER -
Effect of L.S.D. on nerve cells.
Umschau., 1968, 68, 536.
- 86 - NORSTRAND (I.F.), GLANTZ (M.D.), and SASS (M.) -
Comparative activity of guanase in various levels of the central nervous system, and in the spinea fluid of man.
Proc. Int. Congr. Neuropathol. 5 th. Zurich., 1965, 963-965 (Pub. 1966).
- 87 - NYSSSEN (M.) et DORCHE (J.) -
Application de l'automation à la détermination de l'activité guanasi-
que du sérum humain.
Clin. Chim. Acta., 1968, 22, 363-372.
- 88 - PAGE (E.W.) and GLENDENING (M.B.) -
First conference on gestation New-York, 1954, L.B. Flexner, editor,
p. 255.
- 89 - PALLADIN (A.V.), POLYAKOVA (N.M.) and MALYSHEVA (M.K.) -
Deaminase of the brain and of its intracellular structures.
Biochim. Funkst, New, Sist. mater. Mezhdunar. Sim. Leningrad, 1967,
1965, 104-109.
- 90 - PARNAS -
Biochem. Z., 1924, 125, 1.

- 91 - PIERRE (L.L.) -
Guanase activity of the symbionts and fat bodies of Cockroach : *Leucophea Maderae*.
Nature, 1965, 208, 666-667.
- 92 - POLIS (D.) in KEHY (S.S.) and ELKES (J.) -
Proc. 4 th. *Intern. Neurochem. Symposium*. Varenna. Italy., 1961, 37.
- 93 - POLYAKOVA (N.M.) and MALYSHEVA (M.K.) -
Localization of enzymes in various fractions of brain proteins separated by electrophoresis on agar.
Dokl. Akad. Navk. SSSR., 1962, 144, 1394-1397.
- 94 - RABINOWITZ (J.C.) and BARKER (H.A.) -
Fermentation of purine by clostridium *Cylindrosporum*.
J. Biol. Chem., 1956, 218, 161.
- 95 - RAKOSKY (J.) and BECK (J.V.) -
Evidence for the presence of guanase.
J. Bact., 1955, 69, 563-565.
- 96 - RAKOSKY (J.), ZIMMERMAN (L.N.) and BECK (J.V.) -
Isolation and characterization of guanase.
J. Bact., 1955, 69, 566-570.
- 97 - RAPPOPORT (D.A.), FRITZ (R.R.), ALLAN (J.R.) and MORACZEWSKI (A.) -
Nucleoside metabolism in brain extracts.
J. Neurochem., 1960, 6, 21.
- 98 - RASHBA (O.Y.) and TSINKALOVSKA (S.M.) -
Methods for separation of desoxyribonucleic acid from bacteria Breslan.
Mikrobiol. Zh. Kiev., 1956, 18, n° 1, 47-50.
- 99 - RICHERT (D.A.) and WESTERFIELD (W.W.) -
J. Biol. Chem., 1950, 184, 203.
- 100 - ROUSH (A.) -
Yeast adenase.
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 50, 510-512.
- 101 - ROUSH (A.) and BETZ (R.F.) -
Adenosine deaminase of crustaceans.
Biochim. Biophys. Acta., 1956, 19, 579-580.

- 102 - ROUSH (A.) and NORRIS (E.R.) -
Deamination of 8-azaguanine by guanase.
Arch. Biochem., 1950, 29, 124-129.
- 103 - ROY (J.E.)-
Lingcod muscle guanine deaminase.
Canad. J. Biochem., 1967, 45, 1263-1269.
- 104 - ROY (J.F.) and ROY (K.L.) -
The mechanism and specificity of guanine deaminase.
Canad. J. Biochem., 1967, 45, 1263-1269.
- 105 - SCHMIDT (G.) -
Über der fermentativen abba der guanylsäure in der Kaninc hen leber.
Z. Physiol. Chem., 1932, 208, 185-224.
- 106 - SCHMIDT (G.) -
Microdeterminations of purine substances in tissues.
Z. Physiol. Chem., 1932, 208, 185-224.
- 107 - SCHMIDT (G.) and LEVENE (P.A.) -
J. Biol. Chem., 1928, 126, 423-434.
- 108 - SCHMITZ, HURLBERT, and POTTER -
J. Biol. Chem., 1954, 209, 41.
- 109 - SHUZO ISHIDA -
Metabolic patterns in pelecypode distribution of guanine deaminating activity in the soft parts of some marine species.
Tôhoku Gaigaku Asamushi Rinkal Jikens Hôkoku, 1956, 8, 9-18.
- 110 - SOBEL (A.E.), MAYER (A.M.) and GOTTFRIED (S.P.) -
A convenient titrimetric ultramicromethod for the estimation of urea and Kjeldahl nitrogen.
J. Biol. Chem., 1944, 156, 355-363.
- 111 - SORET (L.) -
Arch. Sc. Phys. et Nat., 1883, 10, 429.
- 112 - STERN (H.), ALLFREY (V.), MIRSKY (A.E.) and SAETREN (H.) -
Some enzymes of isolated nuclei.
J. Gen. Physiol., 1952, 35, 559.

- 113 - SUMMER (B.F.) -
Vision and guanine production in fishes.
Proc. Nat. Acad. Sc., 1944, 30, 285-294.
- 114 - TALWAR (G.P.), GEOL (B.K.), MANSOOR (M.) and PANDA (N.C.) -
Guanase activity in rat brain.
J. Neurochem., 1961, 8, 310.
- 115 - TALWAR (G.P.) and PANDA (N.C.) -
Effect of growth hormone administration on the activities of 5' Nucleotidase, adenase, guanase and xanthine oxydase.
Biochem. J., 1962, 82, 173-175.
- 116 - TALWAR (G.P.), SADASIVUDU (B.) and CHITRE (V.S.) -
Changes in the pentose nucleic acid content of subcellular fractions of the brain of the rat during metrazol convulsions.
Nature, 1961, 191, 1007-1008.
- 117 - TARR (H.L.A.) -
Lingcod Muscle Purine nucleoside phosphorylase.
Can. J. Biochem. Biophys., 1958, 36, 517.
- 118 - THOMAS (J.) -
The composition of isolated cerebral tissue.
Purines: Biochem. J., 1957, 66, 655.
- 119 - THRELFALL -
An analytical procedure for the acid soluble phosphorus compounds in rats skeletal muscle:
Biochem. J., 1957, 65, 694.
- 120 - TSUYUKI -
Multiple elution of protein zones from starch gel electrophoretically.
Anal. Biochem., 1963, 6, 205.
- 121 - VRBA (R.) and FOLBERGROVA (J.) -
Endogenous metabolism in brain in vitro and in vivo.
J. Neurochem., 1959, 4, 338-349.
- 122 - WATTIAUX (R.) and DUVE (C. de) -
Tissue fractionation studies.
Biochem J., 1956, 63, 606-608.

- 123 - WESTERFIELS (W.W.) and RICHERT (D.A.) -
The xanthine oxidase activity of rat tissue.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1949, 71, 181.
- 124 - WHITEHOUSE (J.L.), KNIGHTS (E.M.), SANTOS (C.L.) and HUE
(A.C.) -
Clinical evaluation of serum guanase as a liver function test.
Clin. Chem., 1964, 10, 632.
- 125 - ZAKHAROVA (I.Y.) -
Activity of deaminases of purines and nucleic acids in secondary cultures, regenerated from the filtrates of *Bacillus Bresln*, and the original cultures.
Mikrobiol. Zhur. Akad. Nauk. Ukr. R.S.R., 1957, 19, 17-24.
-

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES	3
— Chapitre I : Historique et définition de l'enzyme	5
—Chapitre II : Le métabolisme des Purines	8
— Chapitre III : Technique de détection et de dosage	12
— Chapitre IV : Purification, isolement et constitution de l'en- zyme	21
— Chapitre V : Préparation de l'enzyme	26
— Chapitre VI : Propriétés de la guanine — désaminase — Cinétique enzymatique	35
— Chapitre VII : Effecteurs et inhibiteurs	42
— Chapitre VIII: Rôle physio-pathologique	52
DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES EXPERIMENTALES	61
— Chapitre I : Technique de dosage de la guanine désaminase	63
— Chapitre II : Influence de la congélation	68
— Chapitre III : Activité guanine désaminasique chez «Cavia Cobaya»	72
— Chapitre IV : Activité guanine désaminasique chez «Vipera Aspis»	88
— Chapitre V : Activité guanine désaminasique du sang de di- verses espèces animales	102
— Chapitre VI : Esquisse d'interprétation	107
RESUME ET CONCLUSION GENERALE	111
BIBLIOGRAPHIE	115

